

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

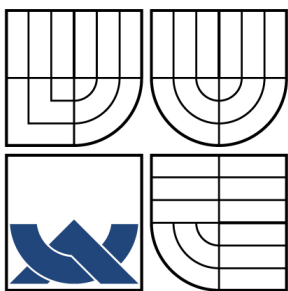
STANOVENÍ KASEINOVÝCH FRAKCÍ V KRAVSKÉM MLÉCE
DETERMINATION OF CASEINS IN COW MILK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

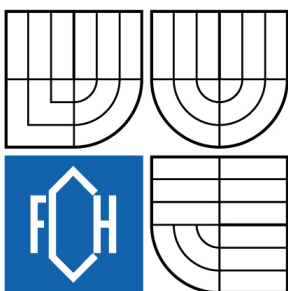
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUCIE GEJDOŠOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ KASEINOVÝCH FRAKCÍ V KRAVSKÉM MLÉCE

DETERMINATION OF CASEINS IN COW MILK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

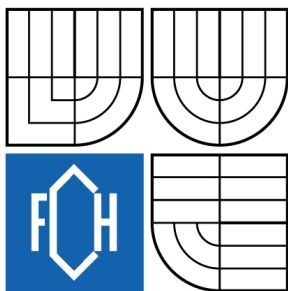
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUCIE GEJDOŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

FCH-DIP0155/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Gejdošová Lucie

Studijní program

Chemie a technologie potravin (M2901)

Studijní obor

Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)

Vedoucí diplomové práce

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce

Název diplomové práce:

Stanovení kaseinových frakcí v kravském mléce

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- a) Mléčné kaseiny, jejich vlastnosti a využití
- b) Vliv výživy hovězího dobytka na složení mléka
- c) Přehled metod kapilární elektroforézy pro stanovení kaseinů

Experimentální část:

- a) Výběr elektroforetického systému pro stanovení kaseinů a jeho ověření na standardech
- b) Úprava matrice pro vybranou metodu stanovení
- c) Stanovení kaseinů ve vzorcích mléka
- d) Zpracování a vyhodnocení získaných výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Lucie Gejdošová
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vypracováním analytické metody pro stanovení kaseinů v kravském mléce. Jako separační metoda byla použita kapilární elektroforéza (CE). Vyvinutý postup byl ověřen na reálných vzorcích.

Teoretická část diplomové práce podává základní informace o kaseinech. Jsou popsány jejich chemické a fyzikální vlastnosti, struktura, způsob výroby, využití v potravinářství a nepotravinářské (technické) uplatnění. Dále jsou zde uvedeny některé nutriční faktory, jejichž aplikace ve výživě skotu ovlivňuje skladbu mléka, zejména pak koncentraci mléčných bílkovin. Literární rešerše obsahuje i přehled metod CE pro stanovení kaseinů.

Praktická část uvádí použitý separační systém, postup izolace kaseinů z mléčné matrice a obsah kaseinů v jednotlivých stanovovaných vzorcích mléka. Separace mléčných kaseinů probíhaly v nepokryté křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm a celkovou délkou 96 cm (efektivní délka 71 cm). Jako základní elektrolyt byl použit 10 mM fosfátový pufr o pH 2,5. Kaseiny byly z mléka získány isoelektrickým vysrážením (pH 4,6) po přidání 10% kyseliny octové. Izolovaný produkt byl zbaven tuku propráním v acetonu a vysušen. Výtěžek celkového kaseinu byl nejvyšší u bio mléka (27,04 g/l) a nejnižší v odtučněném trvanlivém mléce (22,04 g/l).

Tato diplomová práce vznikla na základě spolupráce mezi Ústavem chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické, Vysokého učení technického v Brně a Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Oddělení fyziologie výživy zvířat, v Pohořelicích.

ABSTRACT

The diploma thesis is dealing with design of analytical method for determination of caseins in cow's milk. Capillary electrophoresis was used as separative method. The developed procedure was verified on real samples.

Theoretical part gives basic information about caseins. Their chemical and physical properties, structure, way of manufacturing, usage in food industry and non-food applications are described. There are further some nutritional factors mentioned, whose application in cattle nutrition can affect milk composition, especially milk protein concentration. Literary part contains summary of capillary electrophoresis methods used for casein determination.

Experimental part describes used separative system, procedure of casein isolation from milk and casein content in individual milk samples. Separation of milk caseins was performed in an untreated fused-silica capillary with dimensions of 50 μm i.d. x 96 cm total length (71 cm effective length). Phosphate buffer (10 mM, pH 2,5) served as the background electrolyte. Casein from milk was obtained by isoelectric precipitation at pH 4,6 after adding 10% acetic acid. Product was washed with acetone to remove fat and dried. Total casein yield was the highest in bio-milk (27,04 g/l), the lowest in skim long-life milk (22,04 g/l).

The diploma thesis has arisen on the basis of cooperation of Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology and Research Institute for Cattle Breeding, Ltd., Department of Animal Nutrition Physiology in Pohořelice.

KLÍČOVÁ SLOVA

složení kravského mléka, výživa dojníc, stanovení mléčných kaseinů, kapilární zónová elektroforéza

KEYWORDS

bovine milk composition, dairy cow nutrition, milk casein determination, capillary zone electrophoresis

GEJDOŠOVÁ, L. *Stanovení kaseinových frakcí v kravském mléce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 63 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala všem, kteří se na vzniku této práce jakkoliv podíleli, především RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za praktické rady a připomínky. Děkuji také pracovišti Výzkumného ústavu pro chov skotu, s.r.o. v Pohořelicích a ing. Sylvii Hadrové za poskytnuté vzorky mléka. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za veškerou podporu během celého studia.

OBSAH

ABSTRAKT/ABSTRACT	3
KLÍČOVÁ SLOVA/KEYWORDS	3
PROHLÁŠENÍ	4
OBSAH	5
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Proteiny mléka	8
2.2 Kaseiny.....	8
2.2.1 Klasifikace kaseinových frakcí	8
<i>Alfa_S-kasein (α_S-CN).....</i>	<i>8</i>
<i>Beta-kasein (β-CN).....</i>	<i>9</i>
<i>Kappa-kasein (κ-CN)</i>	<i>9</i>
2.2.2 Heterogennost kaseinů	9
<i>Stupeň fosforylace</i>	<i>9</i>
<i>Stupeň glykosylace κ-CN.....</i>	<i>9</i>
<i>Genetický polymorfismus</i>	<i>10</i>
<i>Disulfidické vazby mezi kaseiny</i>	<i>10</i>
<i>Proteolýza kaseinů plazminem</i>	<i>10</i>
2.2.3 Další důležité molekulární vlastnosti kaseinů	10
2.2.4 Kaseinové micely	10
<i>Složení a základní vlastnosti</i>	<i>10</i>
<i>Struktura.....</i>	<i>11</i>
2.2.5 Výroba bílkovinných koncentrátů	12
<i>Nerozpustné bílkovinné koncentráty</i>	<i>12</i>
<i>Rozpustné bílkovinné koncentráty.....</i>	<i>12</i>
2.2.6 Funkční (fyzikálně – chemické) vlastnosti kaseinů	14
<i>Rozpustnost.....</i>	<i>14</i>
<i>Reologické vlastnosti.....</i>	<i>14</i>
<i>Hydratace</i>	<i>14</i>
<i>Tvorba gelu</i>	<i>14</i>
<i>Povrchová aktivita.....</i>	<i>15</i>
2.2.7 Použití kaseinu a kaseinových produktů	15
<i>Využití v potravinářství</i>	<i>15</i>
<i>Nepotravinářské (technické) aplikace.....</i>	<i>16</i>
2.3 Složení mléka.....	18
2.3.1 Syntéza mléka a jeho složek.....	18
2.3.2 Faktory ovlivňující složení mléka	18
2.3.3 Nutriční vlivy na obsah bílkovin v mléce	19
2.3.4 Vliv výživy na obsah a složení mléčného tuku	22
2.3.5 Nutriční vlivy na obsah laktózy	22

2.3.6	Vliv výživy na koncentraci vitaminů a minerálních látek.....	23
2.3.7	Sója jako krmivo	23
2.4	Metody kapilární elektroforézy pro stanovení kaseinů	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Přístroje a pomůcky	29
3.1.1	Používané přístroje	29
3.1.2	Používané pomůcky	29
3.2	Chemikálie a vzorky	30
3.2.1	Používané chemikálie	30
3.2.2	Vzorky mléka	30
3.3	Použité pracovní postupy	31
3.4	Vybrané validační parametry	32
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1	Volba separačního systému.....	33
4.1.1	Výběr redukčního pufru	33
4.1.2	Výběr separačního napětí	35
4.1.3	Volba doby nástřiku	35
4.1.4	Optimalizované separační podmínky	36
4.2	Identifikace kaseinů v elektroferogramu.....	36
4.3	Sestrojení kalibračních závislostí	38
4.4	Analýza reálných vzorků mléka	40
4.4.1	Trvanlivá mléka ošetřená UHT záhřevem	40
4.4.2	Čerstvá mléka ošetřená pasterizací	43
4.4.3	Sušené polotučné mléko	45
4.4.4	Lyofilizovaná mléka.....	46
4.5	Validační parametry	50
5	ZÁVĚR.....	51
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54
7	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	59
8	SEZNAM PŘÍLOH	60

1 ÚVOD

Mléko hraje od nepaměti ve výživě člověka jednu z nejdůležitějších rolí. Je to výživná potravin s vyváženým obsahem proteinů, lipidů i sacharidů a je také zdrojem celé řady vitamínů a minerálních látek, zejména vápníku. Za nejdůležitější složku jsou pokládány mléčné bílkoviny, které jsou tvořeny 18 esenciálními aminokyselinami potřebnými pro lidské tělo.

Průměrný obsah bílkovin v kravském mléce je 3,3 %. Z toho je přibližně 80 % tvořeno kaseiny. Kasein v mléce existuje ve formě soli jako fosfokaseinát vápenatý. Acidifikací mléka nebo působením syřidla dochází k jeho vysrážení, což je podstatou výroby sýrů a tvarohů. Po biologické stránce je to velmi hodnotná bílkovina, která ve výživě významně doplňuje neúplné rostlinné proteiny.

Kasein byl díky snadnému způsobu získávání (isoelektrické srážení, koagulace pomocí syřidla) komerčně vyráběn již od počátku 20. století. Z počátku měl menší ekonomický význam, byl používán pouze jako technická surovina, např. pro výrobu lepidel, plastů nebo klíždí. Od 60. let 20. století se kasein začal díky svým jedinečným funkčním vlastnostem užívat i jako přísada do potravin a jeho hodnota tak mnohonásobně vzrostla. Jeho užití v potravinách je široké. Přispívá hlavně k nutriční hodnotě a fyzikálnímu charakteru mnoha výrobků, zlepšuje jejich strukturu, našlehanost, hustotu i chuť. Dnes se aplikuje například do sýrových náhražek, instantních polévek, do šlehaných výrobků nebo také k fortifikaci mouky a cereálií. Z kaseinu se dále vyrábí kaseináty, koprecipitáty nebo bílkovinné koncentráty, které mají v potravinářském průmyslu také své místo jako přísady.

Množství kaseinů v kravském mléce ovlivňuje mnoho faktorů, které se většinou překrývají. Z nenuutričních činitelů je to především plemeno, dědičnost, věk a zdravotní stav zvířete, stádium laktace nebo roční období. Nejrychlejší způsob jak docílit žádoucích změn v obsahu kaseinů však představuje výživa dojníc. Příjmem energeticky bohatých krmiv s dostatečným obsahem kvalitních bílkovin, popřípadě doplňováním limitujících aminokyselin ke krmným dávkám, lze pozitivně ovlivnit jak výtěžek, tak i složení kaseinů. Tyto změny se pak odrážejí ve zpracovatelnosti mléka a mají přímý dopad na výtěžek sýru i jeho vlastnosti.

Pro výrobce a zpracovatele mléka tedy představuje zvýšení produkce kaseinů atraktivní způsob, jak pozvednout hodnotu každého litru mléka.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Proteiny mléka

Mléčné proteiny jsou z nutričního hlediska nejdůležitější složkou mléka. Patří k plnohodnotným bílkovinám s obsahem nenahraditelných esenciálních aminokyselin. Jejich množství současně ovlivňuje zásadní technologické vlastnosti mléka jako je kvasnost a sýřitelnost. [1]

Mléko bylo důkladně studováno od počátku 19. století. Původně se předpokládalo, že obsahuje pouze jeden typ bílkovin. Později se však ukázalo, že se mléčné proteiny dají rozdělit na dvě dobře definovatelné hlavní skupiny:

- kaseiny, které se při pH 4,6 a teplotě přibližně 30 °C isoelektricky vysráží z roztoku, tvoří okolo 80 % proteinů kravského mléka.
- syrovátkové neboli sérové proteiny, které za výše uvedených podmínek zůstávají rozpustné. [2,3,4]

Kaseiny a některé syrovátkové proteiny (β -laktoglobulin and α -laktalbumin) jsou syntetizovány mléčnou žlázou, jsou specifické a nenacházejí se tudíž nikde jinde v přírodě. Ostatní bílkovinné frakce (např. bovinní sérový albumin, imunoglobuliny) jsou absorbovány přímo z krve. Bílkoviny syntetizované mléčnou žlázou se vyskytují v několika formách – genetických variantách, které mají odlišnou sekvenci aminokyselin. [4,5]

Kromě kaseinových a syrovátkových proteinů tvoří celkovou (hrubou) bílkovinu mléka ještě dusíkaté frakce nebílkovinného původu, např. volné aminokyseliny, amoniak, kyselina močová, vitamíny B, nukleotidy, kreatin ad. [1]

2.2 Kaseiny

Z počátku byl kasein považován za homogenní protein. Jeho heterogennost poprvé prokázal ve 20. letech 20. století Linderstrøm-Lang se spolupracovníky, dále potvrdil pomocí ultracentrifugace Pedersen (1936) a použitím volné elektroforézy Mellander (1939). Podle klesající elektroforetické mobility byly stanoveny tři složky, které byly označeny jako α -, β - a γ – kasein. V roce 1956 Waugh a von Hippel dokázali, že frakce α -kaseinu obsahuje dva proteiny, z nichž jeden se sráží při působení nízkých koncentrací vápenatých iontů, ten byl nazván α_S -kasein (s – sensitive = citlivý). Druhý protein, který se nesrážel, byl označen jako κ -kasein. [4] Později prokázali Annan a Manson (1969) u α_S -kaseinu ještě dvě odlišné složky, nyní se nazývají α_{S1} - a α_{S2} -kasein. [3]

2.2.1 Klasifikace kaseinových frakcí

Mléko skotu obsahuje 4 rozdílné kaseinové frakce, které se dnes označují jako α_{S1} -, α_{S2} -, β - a κ -kasein. Liší se primární strukturou a stupněm fosforylace. Dříve byly klasifikovány na základě pohyblivosti při elektroforéze na škrobovém gelu a rozpustnosti v močovíně – v současnosti se tyto charakteristiky používají jen jako doplňková kritéria. [1]

Alfa_S-kasein (α_S -CN)

Je hlavní složkou kaseinové frakce mléka a obsahuje nejvíce fosforu. Sráží se roztokem CaCl_2 při teplotě vyšší než 20 °C. V kravském mléce se vyskytuje α_{S1} -kasein a α_{S2} -kasein.

Primární strukturu α_{S1} -kaseinu tvoří 199 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 23,614 kDa. V přítomnosti Ca^{2+} iontů tvoří nerozpustnou sůl. Při proteolýze vznikají fragmenty, které se označují jako λ -kasein. [1,6] Doposud bylo rozpoznáno 8 genetických variant (A, B, C, D, E, F, G, H), v mléce skotu se vyskytuje převážně B frakce. [3]

α_{S2} -kasein je složen z 207 aminokyselin o molekulové hmotnosti 25,230 kDa. Ve srovnání s α_{S1} -CN není tato frakce tak citlivá k přítomnosti Ca^{2+} iontů a sráží se méně. Rozlišují se 4 genetické varianty (A, B, C, D). [1,6]

Beta-kasein (β -CN)

Primární struktura obsahuje 209 aminokyselin o molekulové hmotnosti 23,983 kDa. S Ca^{2+} ionty se sráží a poskytuje sůl rozpustnou při teplotách 1°C a nižších, při vyšších teplotách nerozpustnou. Působením proteolytických enzymů dochází k jeho degradaci na γ -kaseiny [1,6]. Dnes je známo 9 polymorfních variant (A^1 , A^2 , A^3 , B, C, D, E, F, G). [3]

Kappa-kasein (κ -CN)

κ -CN je glykoprotein, který je tvořen jednou hlavní (bezucernou) částí a asi šesti dalšími menšími složkami. Je to směs polymerů spojených disulfidickými můstky. V molekule přítomné di- až tetrasacharidy jsou na protein vázány prostřednictvím glykosidické vazby. Primární strukturu hlavní složky tvoří 169 AMK a celková molekulová hmotnost je 19,007 kDa. S Ca^{2+} ionty tvoří rozpustné soli, které jsou potom schopné stabilizovat α_{S1} - a β -kasein v mléce v přítomnosti iontů vápníku. [1,6] Je popsáno 7 polymorfních genetických variant (A, B, C, E, F^S , F^I , G^S). [3]

2.2.2 Heterogenost kaseinů

Kaseiny kravského mléka vykazují jistou variabilitu, která se označuje jako tzv. mikroheterogenost. Může vzniknout z několika důvodů: [3,4]

- rozdíly ve stupni fosforylace
- v případě κ -CN rozdílný stupeň glykosylace
- genetický polymorfismus
- vazba disulfidickými můstky
- působení mléčných proteas

Stupeň fosforylace

Všechny kaseiny jsou fosforylovány. α_{S1} -CN má 8 nebo 9 fosfátových skupin (PO_4), α_{S2} -CN obsahuje 10 – 13 PO_4 zbytků, v β -CN je 5, popř. 4 PO_4 skupiny a většina molekul κ -CN má navázanou 1 PO_4 skupinu, některé i 2 nebo 3. Fosfátové zbytky jsou v kaseinu esterifikovány na serin a v některých případech i na threonin. [3]

Stupeň glykosylace κ -CN

κ -CN je jediný kasein, který obsahuje sacharidy – konkrétně galaktosu, galaktosamin a kyselinu N-acetylneuraminovou. Vyskytují se jako trisacharidy nebo tetrasacharidy připojené na threonin v C-terminální oblasti kaseinu. Existuje přinejmenším 9 molekulových forem κ -CN, které se liší obsahem a typem navázaných sacharidů. Přítomnost cukrů zvyšuje hydrofilnost kaseinu. [3,4]

Genetický polymorfismus

Jev zvaný genetický polymorfismus je pozorován u všech kaseinů a je následkem substitucí, inzercí a delecí aminokyselin. Genetické varianty jsou specifické pro každé plemeno skotu. Každá genetická varianta také určitým způsobem ovlivňuje vlastnosti mléka, např. složení a množství bílkovin, tepelnou stabilitu nebo tvorbu sýra. [1,3,4]

Disulfidické vazby mezi kaseiny

V molekulách α_{S2} -CN a κ -CN se vyskytují 2 zbytky cysteinu, u kterých dochází k tvorbě intermolekulárních S-S můstků. α_{S2} -CN obvykle existuje ve formě disulfidicky vázaného dimeru, u κ -CN může tímto způsobem dojít ke spojení až 10 molekul. [3,4]

Proteolýza kaseinů plazminem

Plazmin patří k proteolytickým enzymům mléka. Kaseiny vykazují v jeho přítomnosti rozdílnou citlivost. Nejcitlivější je β -CN, který je štěpen na tzv. γ -kaseiny a proteosopeptony. Rychlé hydrolyze plazminem podléhá i α_{S1} -CN, který se štěpí na λ -kasein. Hydrolyze podléhá i α_{S2} -CN, jehož peptidy sice nebyly v mléku identifikovány, ale jsou pravděpodobně součástí proteosopeptonové frakce. κ -CN proteolytickým účinkům plazminu odolává. [1,3,4]

2.2.3 Další důležité molekulární vlastnosti kaseinů

Ke stabilitě kaseinů přispívá jejich velikost – jsou to relativně malé proteiny s molekulovou hmotností 20 – 25 kDa.

Primární strukturu kaseinů tvoří sekvence AMK s nestejným rozložením polárních a nepolárních zbytků. Tvoří se hydrofobní a hydrofilní oblasti a ty kaseinům dodávají silně amfipatickou strukturu, která z nich činí povrchově aktivní látky (dobře tvoří emulze a pěny).

Obsahují velké množství prolinu. Zejména β -CN, který má v molekule 35 prolinových zbytků. Přítomnost prolinu brání tvorbě struktur jako α -helix nebo β -list.

Mají nízký obsah sirných AMK, tím se snižuje jejich biologická hodnota.

Kaseiny jsou poměrně hydrofobní, kvůli nedostatku sekundární a terciární struktury vykazují vysokou povrchovou hydrofobicitu.

Díky své otevřené struktuře podléhají lehce proteolýze (důležité pro stravitelnost a zrání sýra), jsou vysoce stabilní vůči teplu a dalším denaturačním činidlům. [3,4,7]

2.2.4 Kaseinové micely

Micely kaseinu jsou tvořeny složitými bílkovinnými strukturami, které jsou uspořádány do sférických částic s mnoha dutinkami a kanálky vyplněnými vodnou fází. [1]

α_{S1} -, α_{S2} -, β - kasein jsou sráženy při koncentraci vápníku vyšší než 6 mM. Jelikož mléko skotu obsahuje přibližně 30 mM Ca, dalo by se předpokládat, že většina těchto kaseinů bude z mléka vysrážena. Nicméně κ -kasein, který není vůči vápníku citlivý, je schopen ostatní kaseiny ochránit proti precipitaci a stabilizovat je právě tvorbou kaseinové micely. [4,7]

Složení a základní vlastnosti

Až 95 % kaseinu v mléce je agregováno do koloidních částic zvaných micely. Ty jsou přibližně z 94 % složeny z bílkovin a zbývajících 6 % je tzv. koloidní kalcium fosfát (CCP), který je tvořen ionty vápníku, hořčíku, fosfáty a citráty. Micela je také vysoce hydratována, váže 2 - 2,5 g vody na 1 g bílkoviny. [1,4,7]

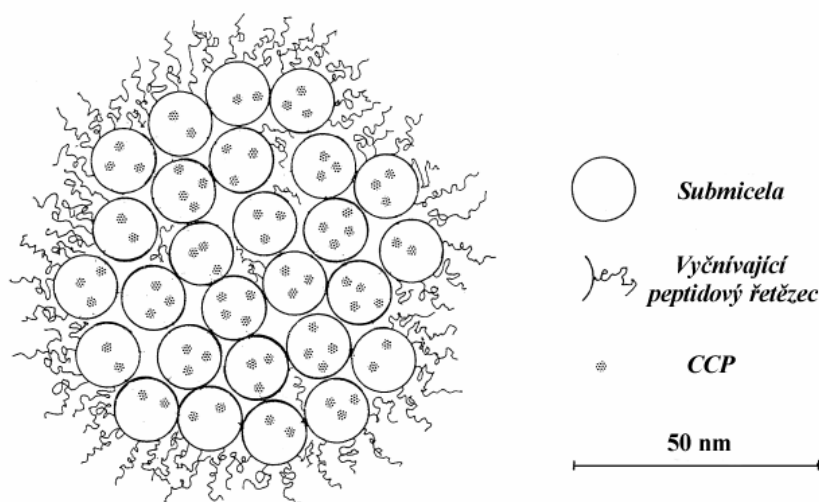
Elektronová mikroskopie ukázala, že micely jsou kulovité částice s průměrem v rozmezí 50 – 600 nm, nejčastěji 120 nm. Průměrná hmotnost částic je 10^8 Da, to znamená, že průměrná micela obsahuje okolo 5000 molekul kaseinů (20 – 25 kDa). V 1 ml mléka je asi 10^{15} micel s celkovým povrchem $5 \cdot 10^4$ cm². Právě velká povrchová plocha micel je významnou funkční vlastností mléčných proteinů. [4,7]

Micely mají schopnost rozptylovat světlo, což je hlavní příčina bílé barvy mléka. [3,4]

Struktura

Struktura kaseinové micely je předmětem výzkumu zejména v posledních 50 letech, přesto je stále sporná. Bylo již navrženo mnoho modelů, z nichž největší podporu má model submicelární (obr.1), který poprvé předložil Morr v roce 1967. Tento model předpokládá, že micela je tvořena submicelami o molekulové hmotnosti 106 Da a průměru 10 – 15 nm. Tyto podjednotky drží pohromadě prostřednictvím CCP, hydrofobních interakcí bílkovin a vodíkových můstků. Celá micela je obklopena a stabilizována povrchovou vrstvou bohatou na κ -kasein, který navíc spojuje lineární α_s - a β - kasein do trojrozměrné struktury. Dovnitř micely směřují hydrofobní části kaseinů, hydrofilní polární části jsou na povrchu a nesou tak hydratační obal s celkovým záporným nábojem. [1,3,4,7]

Další submicelární model navrhl v roce 1984 Walstra. Podle něj jsou submicely tvořeny z 20 – 25 kaseinových molekul a jejich průměrná velikost je 12 – 15 nm. Jsou spojeny pomocí hydrofobních interakcí a CCP. Rozlišují se dva hlavní typy submicel – složené z α_s - a β -kaseinu s hydrofobními částmi v centru anebo složené z α_s - a κ -kaseinů, přičemž vyčnívající hydrofilní řetězce κ -kaseinu dodávají micelle stabilizující vláknitou povrchovou strukturu. [8] V roce 1999 byl tento model pozměněn, Walstra uvedl, že CCP netvoří vazby mezi jednotlivými submicelami, ale nachází se uvnitř nich, tím snižuje jejich negativní náboj a podporuje samotnou agregaci do micel. [9]



Obr.1: Submicelární model kaseinové micely [9]

Submicelární model však neměl jednoznačnou podporu a objevilo se několik alternativních modelů. Jedním z nich byl Holtův model (1992), podle kterého je micela spletenou sítí kaseinových molekul spojených mikrogranulemi CCP a obalených povrchovou vrstvou κ -kaseinu. [10]

Další model navrhl Horne (1998). Předpokládá, že proteiny v micely jsou na sebe vázány dvěma typy vazeb – přitažlivými hydrofobními interakcemi a elektrostatickou repulzí. Hydrofobní interakce podporují spojování α_{S1} -CN a β -CN do polymerních řetězců. Některé vazby mezi kaseinovými micelami jsou tvořeny CCP. κ -CN nemá schopnost prodlužovat polymerní řetězec a ukončuje ho tím, že kolem micely tvoří stabilizující vrstvu. [11]

V podstatě všechny modely vycházejí ze dvou základních rysů – stmelující role CCP a povrch tvořený zejména κ -kaseinem. [4,7]

2.2.5 Výroba bílkovinných koncentrátů

Jako bílkovinné koncentráty jsou označovány výrobky z odtučněného mléka, které obsahují více než 80 % bílkovin. Jsou většinou ve formě sušených prášků a granulí, popřípadě jako roztoky, gely nebo pasty. Rozlišují se nerozpustné a rozpustné bílkovinné koncentráty, které se dále dělí podle způsobu výroby do několika kategorií. [12]

Nerozpustné bílkovinné koncentráty

Kyselé kasein

Přidáváním kyseliny se pH mléka snižuje až na isoelektrický bod (pH 4,6). Následným zahřátím na 35 – 50 °C dojde k vysrážení kaseinu. Vedlejším produktem je syrovátka, která se mechanicky oddělí a dále zpracovává. Sraženina kaseinu se promývá, odstřeďuje a suší. Získaný koncentrát se využívá pro technické účely a v potravinářském průmyslu (výroba kaseinátů). [12,13]

Sladký kasein

Je získáván srážením mléka působením syřidel. Vzniklá syřenina se drobí, zahřeje na 65 °C a následně zpracovává jako kyselé kasein. Má hlavně technické využití, v potravinářském průmyslu se používá výjimečně. [12,13]

Koprecipáty nerozpustné

Jsou to bílkovinné koncentráty s obsahem kaseinu i syrovátkových proteinů. Obsahují až 96 % bílkovin mléka. Ke srážení dochází přidávkou 0,5 % chloridu vápenatého a zahřevem na 80 – 90 °C. Nacházejí použití v potravinářství, hlavně díky bobtnavosti a vysoké nutriční hodnotě. [6,12,13]

Rozpustné bílkovinné koncentráty

Kaseináty

Vyrábí se rozpouštěním kaseinu v zásadách, solích nebo kyselinách. Podle použité alkálie vznikají například kaseináty draselné, amonné, vápenaté, hořečnaté a zejména sodné. Reakce probíhá při teplotě 60 – 90 °C a pH 6,9. Vzniklý roztok se suší v rozprašovacích nebo válcových sušárnách. Mají široké uplatnění v různých oborech potravinářského průmyslu, hlavně jako aditiva se schopností vázat vodu, emulgační a pěnotvorné prostředky a také jako nutričně významné látky. [6,12,13]

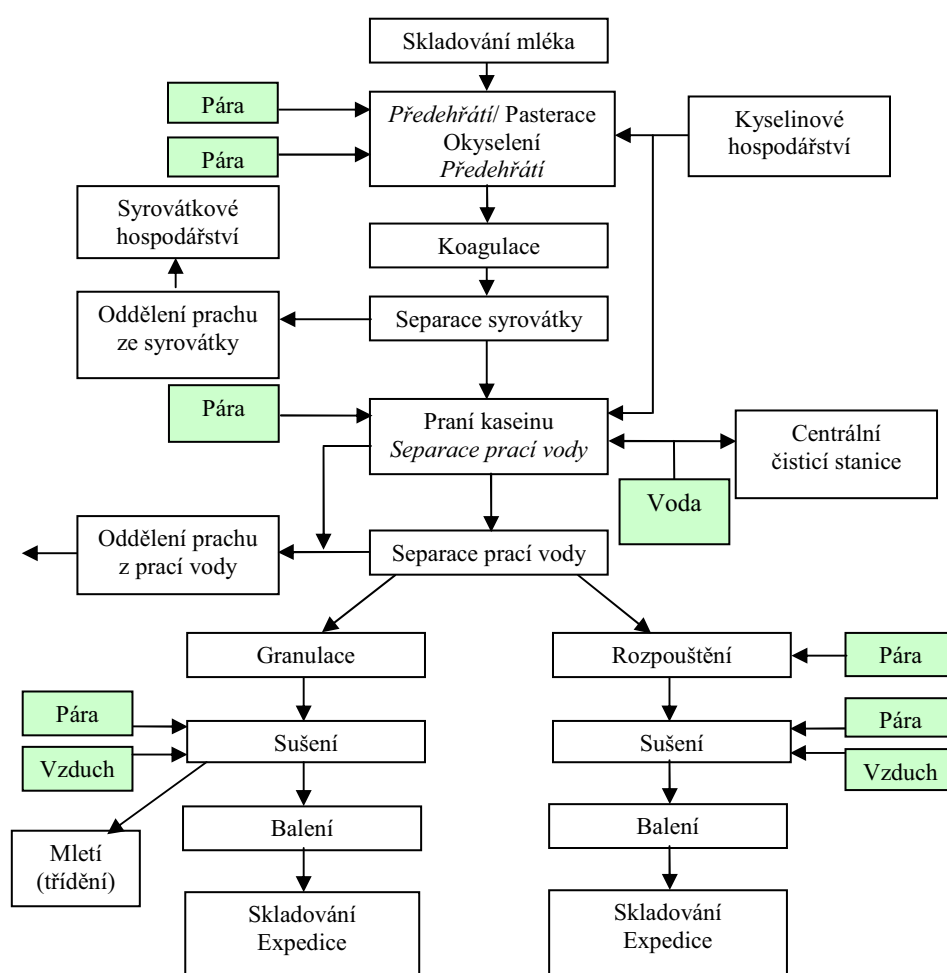
Koprecipitáty rozpustné

Vznikají obdobným způsobem jako kaseináty - rozpouštěním nerozpustných koprecipitátů. Využívají se díky svým emulgačním schopnostem, které jsou však v porovnání s kaseináty o něco nižší. [12]

Výroba koprecipitátů byla rozvinuta za účelem pokrýt větší množství proteinů (až 96 % mléčných bílkovin), nejen kaseinů. [14]

Bílkovinné koncentráty získané pomocí membránových procesů

Ultrafiltrací odtučněného mléka se získávají koncentráty bohaté na bílkoviny, které jsou sušeny. Vyznačují se vysokou rozpustností, emulgačními, vazebnými a pěnotvornými schopnostmi. [12]



Obr.2: Blokové schéma výroby kaseinu [12]

Tabulka 1: Přibližné procentuální složení komerčně vyráběných kaseinů, kaseinátů a koprecipitátů [14]

Složky	Kaseinát sodný	Kaseinát vápenatý	Kyselý kasein	Sladký kasein	Koprecipitát
Protein, N x 6,38(min)	94,0	93,5	95,0	89,0	89 – 94
Popelovina (max)	4,0	4,5	2,2	7,5	4,5
Sodík	1,3	0,05	0,1	0,02	-
Vápník	0,1	1,5	0,08	3,0	-
Fosfor	0,8	0,8	0,9	1,5	-
Laktosa	0,2	0,2	0,2	-	1,5
Tuk (max)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Vlhkost (max)	4,0	4,0	10,0	12,0	5,0
pH	6,6	6,8	-	7,0	6,8

2.2.6 Funkční (fyzikálně – chemické) vlastnosti kaseinů

Pojem „funkční vlastnosti proteinů“ se v souvislosti s potravinami vztahuje na takové fyzikálně chemické vlastnosti, kterými se dá ovlivnit funkčnost potravy, např. textura, barva, chuť, vazba vody nebo stabilita. K nejdůležitějším z těchto vlastností patří rozpustnost, hydratace, reologie, povrchová aktivita a gelovatění. [4]

Rozpustnost

Rozpustnost je důležitá vlastnost, díky které mají proteiny v potravinách mnoho užitečných funkcí. Podle definice jsou kaseiny nerozpustné v isoelektrickém bodě, tedy v rozmezí pH přibližně 3,5 – 5,5, přičemž s rostoucí teplotou se toto rozmezí rozšiřuje. Nerozpustnosti v isoelektrickém bodě se využívá při výrobě kyselého kaseinu, kysaného mléka a čerstvých sýrů. Nerozpustnost nicméně vylučuje užití kaseinu v kyselých tekutinách, jako jsou ovocné džusy obohacené proteiny nebo nápoje syčené oxidem uhličitým. Rozpustný kasein lze připravit částečnou proteolýzou nebo působením některých forem pektinu. [4]

Reologické vlastnosti

V důsledku přístupné struktury a schopnosti vázat velké množství vody tvoří kaseiny poměrně viskózní roztoky. Vysoká viskozita kaseinátů se na jednu stranu užívá ke stabilizaci emulzí, na stranu druhou však spíše způsobuje problémy, protože nelze rozpustit víc jak 20 % proteinů. Tím se zvyšují náklady na sušení, vznikají produkty s nízkým obsahem bílkovin, které se hůře zpracovávají. [4]

Hydratace

Přestože jsou kaseiny poměrně hydrofobní, dokážou vázat kolem 2 g vody na 1 g bílkoviny. Hydratace se navíc zvyšuje s rostoucí hodnotou pH a nezávisí na koncentraci NaCl, což je zvláště důležité pro účinnost kaseinů v masových výrobcích. [4]

Tvorba gelu

Kaseiny tvoří gely při změně okolního prostředí a to hlavně působením syřidla nebo snížením pH k isoelektrickému bodu. K většinou nežádoucímu gelovatění může také dojít působením organických rozpouštědel, delší tepelnou úpravou nebo při skladování tepelně

sterilovaných výrobků. Tvorba gelů indukovaná teplem se využívá pro přípravu mnoha potravinářských výrobků, avšak u kaseinů může být vyvolána jen za vysoce extrémních podmínek. Mimořádná tepelná stabilita kaseinů tedy patří k hlavním výhodám při zpracování mléka. [4]

Povrchová aktivita

Tato významná vlastnost činí z kaseinů dobrá pěnotvorná činidla a emulgátory. PAL jsou molekuly obsahující hydrofilní a hydrofobní část, které reagují s vodnou a bezvodou fází emulzí či pěn, čímž snižují mezifázové nebo povrchové napětí. Pro dobrou povrchovou aktivitu jsou důležité tři strukturní znaky:

- protein by měl být poměrně malý, neboť rychlost migrace k fázovému rozhraní je nepřímo úměrná molekulové hmotnosti
- molekula musí mít relativně vysokou povrchovou hydrofobicitu, aby byla schopná se adsorbovat na rozhraní olej – voda nebo vzduch – voda
- je důležitá flexibilní struktura, aby po adsorpci mohlo dojít k rozevření a rozprostření molekuly po povrchu.

Tyto podmínky kaseiny splňují. Výsledné pěny ve srovnání s pěny tvořenými vaječným albuminem však nejsou tolik stabilní (stěny bublin jsou tenčí a rychleji praskají). [4]

2.2.7 Použití kaseinu a kaseinových produktů

Díky struktuře a funkčním vlastnostem našel kasein využití v mnoha potravinářských i nepotravinářských výrobcích. Užívá se v mnoha odvětvích průmyslu – např. v papírenství, výrobě barev, adheziv, plastů, vláken, kožedělství, potravinářství a při výrobě krmiv. [14]

Využití v potravinářství

Kasein se obvykle přidává do potravin jako přísada, která pozměňuje fyzikální vlastnosti nebo zvyšuje výživovou hodnotu daného produktu. [4]

Tabulka 2: *Stručný přehled užití kaseinů, kaseinátů a koprecipitátů v potravinářských výrobcích [4]*

Výrobek	Užití	Funkce/ význam
Pekařské výrobky	Chléb, sušenky, snídaňové cereálie, dortové směsi, pečivo, mražené moučníky a pečivo, polevy na pečivo	Nutriční, senzorická, emulgátor, konzistence, textura, objem a výtěžek těsta
Mléčné výrobky	Imitace sýrů = alternativní sýry (z kaseinů/ kaseinátů, rostlinného tuku, soli a vody)	Vázání vody a tuku, vylepšení textury, tavicí vlastnosti, vláknitost, možnost strouhání
	Smetana do kávy (kaseinát sodný, zeleninový tuk, cukr, stabilizátory, emulgátory)	Emulgátor, bělidlo, zlepšení hustoty a textury, senzorické vlastnosti
	Šlehané výrobky (např. jogurty)	Ztužení, zmírnění synereze
	Mléčné nápoje, koktejly, náhražky mléka, obohacená mléka	Nutriční, emulgační, pěnotvorná funkce
	Prášky s vysokým podílem tuku, pokrmové tuhy, topingy, máslové pomazánky	Emulgátor, vylepšení textury, senzorické vlastnosti

Pokračování

Nápoje	Čokoládové, šumivé a ovocné nápoje	Stabilizátor, podpora šlehatelnosti, tvorba pěny
	Krémové likéry, vinné aperitivy	Emulgátor
	Víno, pivo	Odstranění drobných nečistot, číření, zjemnění barvy a trpkosti
Dezerty	Zmrzlina, mražené dezerty	Vliv na šlehatelnost, hustotu, texturu
	Šlehané pěny, instantní pudinky, topingy	Šlehatelnost, filmotvorná látka, emulgátor, zlepšení hustoty a chuti
Cukrovinky	Karamely	Dodání pevné, pružné, žvýkavé struktury, vazba vody, emulgátor
	Marshmallow, nugát	Tvorba pěny, vysoká tepelná stabilita, vylepšení chuti a hnědé barvy
Těstovinové výrobky	Makarony, těstoviny, imitace těstovin	Nutriční, texturní funkce, stabilita při zmrazování / rozmrazování, použitelnost v mikrovlnné troubě
Masové výrobky	Výrobky z mletého masa	Emulgátor, vazba vody, lepší konzistence
Potraviny pro rychlou přípravu	Směsi pro přípravu omáček, polévek, konzervované krémové polévky, omáčky, dehydratované polévky, omáčky, dresinky, jídla do mikrovlnky, jídla s nízkým obsahem tuku	Bělidlo, mléčná chuť, zlepšení chuti, emulgátor, stabilizátor, regulátor viskozity, stabilita při zmrazování/rozmrazování, náhrada vaječných žloutků a tuku
Další přípravky	Speciální výživové preparáty pro nemocné, rekonvalescenty, lidi držící dietu, sportovce, astronauty, kojenecká strava, nitrožilní výživa	Nutriční význam

Nepotravinářské (technické) aplikace

Kasein se již od počátku 19. století používal při výrobě velkého množství technických produktů. [15]

Adheziva

Vysoký obsah polárních skupin ovlivňuje dobrou adhezi kaseinátů na různé podklady (dřevo, sklo, papír). [15]

Lepidla vyráběná z kaseinu mají využití i dnes, hlavně při práci se dřevem. Po uschnutí mají středně vysokou pevnost a jsou odolné vůči vodě a vlhké atmosféře. [16]

Nátěrové látky a klíždla

Kaseinovými barvami lze natírat nejrůznější pevné povrchy včetně dřeva a omítek. [16] Kasein může sloužit jako pojivo pro krycí materiál, což je většinou směs minerálních látek, která se nanáší v tenké vrstvě na určitý povrch.

V papírenství se kasein užívá jako klíh pro velmi kvalitní lesklé papíry. Dále měl využití k impregnaci textilních tkanin a apretaci kůže. [15]

Textilní vlákna

Syntetická vlákna z kaseinu jsou podobná ovčí vlně. Jejich užití je však omezené, nemají takovou sílu. Po namočení navíc ztrácí svou pevnost a poddajnost. [17]

Pevné plasty

Plasty jsou z kaseinu vyráběny plastifikací ve vodě, vytlačováním a následným zesíťováním pomocí formaldehydu. Jsou to materiály podobné rohovině, jsou dostupné v široké paletě barev a tvarů a jsou příjemné na omak. Dříve se díky pěknému vzhledu hodně užívaly k výrobě ozdobných předmětů, knoflíků, sponek, tužek apod. [18]

Jako první se plasty z kaseinu objevily na počátku 20. století ve Francii a Německu pod obchodním názvem „Galalit“. V současnosti jsou tyto materiály nahrazovány syntetickými polymery s lepšími vlastnostmi. [15]

Biomateriály a potahové filmy

Proběhla předběžná studie, která potvrdila, že termoplasty založené na kaseinu mají vyhovující mechanické vlastnosti, dobře se odbourávají a díky bioaktivnímu charakteru by se mohly používat jako biomedicínské materiály. V této oblasti je však ještě potřeba určitých vylepšení, co se týče mechanické pevnosti a hydrolytické stability. [19]

Kaseinové filmy se dají používat jako obalové materiály. Přispívají k tomu hlavně vlastnosti jako průsvitnost, biologická odbouratelnost a výhodné technické vlastnosti. K nevýhodám těchto materiálů patří omezené mechanické vlastnosti a citlivost k vodě a vodní páře, tyto nedostatky se však dají překonat přidáním změkčovadel. Hydrofilní kaseinové filmy jsou účinnou bariérou pro nepochůdné látky jako kyslík, oxid uhličitý nebo aroma. [15]

Z mléčných proteinů jsou vyráběny jedlé obaly a filmy, které slouží jako bariéra pro kyslík, zamezují ztrátě vlhkosti a aroma, vykazují dobrou pevnost v tahu, jsou pružné, bez chuti a vůně. Příkladem jsou potahy na čerstvém ovoci a zelenině nebo zmrazených potravinách. [20]

Aditiva

Vzhledem ke své amfipatické struktuře se kaseiny často používají jako emulgátory nebo stabilizátory. Např. v barvách na vodní bázi, do betonu a cementu, do kosmetických přípravků a dalších průmyslových produktů. [15]

2.3 Složení mléka

V mnoha případech může být změna ve složení mléka výhodná. Spotřebitelé dnes požadují takové výrobky živočišného původu, které mají méně tuku a více proteinů. Zájmem výrobců mléka je zvýšit obsah kaseinu a díky tomu dosáhnout lepších výtěžků sýra nebo získat větší koncentraci nenasycených mastných kyselin v mléce, které mají vliv na jemnost másla. Také odborníci na výživu prosazují změny složení mléka tak, aby prospívalo zdraví, například snížení obsahu nasycených mastných kyselin anebo zvýšení koncentrace omega-3 mastných kyselin, konjugované kyseliny linolové (CLA) nebo bioaktivních peptidů. [21]

Hlavními prostředky, kterými je možné ovlivnit skladbu mléka, jsou výživa a šlechtění. Techniky šlechtění jsou pomalé, proto je výhodnější změna stravy dojníc, která přináší mnohem rychlejší odezvu. [22]

2.3.1 Syntéza mléka a jeho složek

Mléko se tvoří v sekrečních epitelových buňkách mléčné žlázy během procesu laktace. Živiny, které jsou pro jeho syntézu potřebné, se čerpají z krve. Některé složky přecházejí z krve do mléka přímo, např. minerální látky, vitamíny, voda. Jiné musí být nejdříve syntetizovány. [23]

Mléčný tuk je složen z mastných kyselin s krátkým a dlouhým řetězcem. Prekurzory pro tvorbu mastných kyselin s krátkým řetězcem jsou především kyselina octová a máselná, které vznikají fermentací vlákniny v batoru, a dále kyselina β -hydroxymáselná, ta pochází z krve. Mastné kyseliny s delším řetězcem přecházejí do mléka přímo z krve, kam se dostávají hlavně z tělní tukové tkáně, lipidů v potravě nebo metabolismem tuků. [24,25]

Základními prekurzory k syntéze mléčného proteinu jsou aminokyseliny. Záleží nejen na jejich množství, ale i na vyváženém příjmu. Některé albuminy a imunoglobuliny se dostávají do mléka rovnou z krve. [24,25]

Mléčná laktóza je tvořena z glukózy, která je také odebírána z krve při jejím průtoku přes mléčnou žlázu. [26]

2.3.2 Faktory ovlivňující složení mléka

Na výsledné složení kravského mléka má vliv řada podmínek a faktorů, které se dají rozdělit do dvou hlavních skupin:

Nenutriční faktory

- 1) Dědičné faktory – plemeno – změny složení mléka prostřednictvím tradičních technik šlechtění jsou velmi pomalé, výsledek se projeví až po mnoha letech
- 2) Roční období – obsah tuku a bílkovin v mléce je vyšší během zimních měsíců a nejnižší v létě, což souvisí s typem dostupné stravy
- 3) Stádium laktace – koncentrace mléčných složek je nejvyšší během časně a pozdní fáze laktace
- 4) Stáří – s rostoucím věkem dojnice postupně nastává redukce bílkovin v mléce, obsah tuků zůstává přibližně stejný
- 5) Onemocnění – zánětlivá onemocnění vemene (mastitidy) obvykle snižují obsah tuku a kaseinů, naopak vzrůstá množství sérových proteinů v mléce [22,24]

Nutriční faktory

Výživa představuje nejefektivnější způsob, jak dosáhnout rychlé změny ve složení mléka. Téměř všechny složky mléka se tímto způsobem dají ovlivnit. Ke změně skladby mléka dochází, pokud jsou do výživy dojnic zahrnuty požadované živiny, ty jsou absorbovány a transportovány do mléčné žlázy a následně vylučovány do mléka. Ze složek mléka reaguje na stravu nejvíce mléčný tuk, jeho obsah může být změněn až o 3 %. Proteiny mléka jsou výživou ovlivněny méně, v rozmezí okolo 0,5 %, nejméně ovlivnitelný je obsah laktózy. Změny složení nemusí však být vždy zřetelné. Příkladem může být situace, kdy celková koncentrace bílkovin zůstává konstantní, ale jejich skladba je jiná (poměr kaseinů k dalším dusíkatým látkám apod.). [21,27]

Nicméně vztah mezi jednotlivými živinami ze stravy a složkami mléka není jednoduchý. Nemusí platit, že při zkrmování vyššího množství určité živiny se následně zvýší její vylučování do mléka a vzroste tak její koncentrace. [22]

2.3.3 Nutriční vlivy na obsah bílkovin v mléce

Co se týče mléčných proteinů, může výživa dojnic ovlivnit jak jejich výtěžek (kvantita – kg proteinu za den), tak i jejich obsah (procento). [30] Změny výživy mohou často pozitivně ovlivnit výtěžek mléka a proteinu, ale efekt na koncentraci proteinu v mléce je opačný. Záměrem je však většinou zvyšovat obsah bílkovin při stejných nebo vyšších výtěžcích mléka. [27]

Příjem bílkovin ve stravě

Aby mohlo dojít ke zvýšení obsahu mléčných proteinů, musí kráva ve stravě přijímat hlavně dostatek kvalitních bílkovin. Nesmí však přijímat jejich nadbytek, který by mohl vést ke zdravotním a reprodukčním komplikacím. [27]

Emery uvedl, že s každým zvýšením hrubého proteinu v krmné dávce o 1 % roste koncentrace bílkovin v mléce o 0,02 %. Nepočítal však s odbouratelností bílkovin potravy v batoru. [29]

Většina bílkovin ze stravy je v batoru odbourávána až na amoniak, který slouží batorovým bakteriím k výstavbě mikrobiálního proteinu. Jeho syntéza závisí na dostatku dusíku a energie, která je pro bakterie dostupná, nebo kterou si dokáží vytvořit fermentací. [30,31] Pro maximalizaci množství mléčných bílkovin je důležité zvýšit produkci mikrobiálního proteinu. Jeho trávením a absorpcí v tenkém střevě vzniká přes 60 % aminokyselin potřebných pro tvorbu bílkovin v mléce. [32] To znamená zprostředkovat dobře stravitelná krmiva, co nejvíce zvýšit příjem sušiny, poskytnout v přiměřeném množství rozpustný a odbouratelný protein a synchronizovat v batoru dostupné sacharidy a proteiny. [24]

Dalším zdrojem aminokyselin požadovaných k syntéze bílkovin mléka je neodbouratelný protein. Je to množství bílkovin přijatých v krmivu, které nejsou v batoru odbourávány a postupují do tenkého střeva. Podle druhu krmiva se množství nedegradovatelného proteinu liší.

Mikrobiální a neodbouratelný protein tvoří dohromady tzv. využitelný protein, který zásobuje dojnici potřebnými bílkoviny. 70 – 80 % využitelného proteinu má mikrobiální původ, zbývajících 20 – 30 % potom představuje neodbouratelný protein z krmiva. Při příjmu

nadbytku proteinů, které nejsou odbouratelné, hrozí riziko poklesu syntézy mléčných bílkovin. [29,30]

Byl zkoumán i vliv postruminálně podávaných proteinů. Jako zdroj proteinů byly vyzkoušeny infuze kaseinu do žaludku dojníc. Výtěžek mléka i proteinů se zvýšil. Stejně tomu bylo u koncentrace bílkovin mléka. Může to být důsledkem toho, že kasein poskytuje limitující aminokyseliny pro mléčnou syntézu. [33]

Doplňování aminokyselin

Základem mnoha studií jak podpořit výtěžek nebo koncentraci mléčných bílkovin je zásobení mléčné žlázy větším množstvím aminokyselin nebo změna jejich profilu tak, aby bylo k dispozici více esenciálních a limitujících aminokyselin. [34] Výstavba mléčných proteinů je obvykle limitována aminokyselinou, která se vyskytuje v nejnižším množství s ohledem na potřeby dojníc. Do jejich stravy jsou dnes proto často jednotlivé aminokyseliny zařazovány. [24] Dodnes není jednoznačné, které aminokyseliny jsou nejvíce limitující při syntéze mléka. U přežvýkavců se uvádí hlavně methionin a lysin. Avšak každá z deseti esenciálních aminokyselin nepřezýkavců byla již ve studiích citována jako potenciálně limitující (např. fenylalanin, histidin, tryptofan). Reakce na suplementaci jednotlivými aminokyselinami nejsou příliš výrazné, proto se v mnoha případech doplňuje 2 – 5 teoreticky limitujících aminokyselin současně. [35]

Schwab et al. (1976) provedl několik experimentů, při kterých byly kravám krmeným převážně kukuřicí a vojtěškou podávány abomasální infuze aminokyselin (přímo do žaludku). U všech pokusů se jako první dvě limitující aminokyseliny pro syntézu mléčných proteinů prokázaly methionin a lysin. Samotné infuze methioninu neměly vliv na sekreci mléka, proteinu ani tuku. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo infuzí lysinu a methioninu současně, avšak ovlivněn byl spíše obsah proteinu v mléce než jeho výtěžek. [36]

Nedoporučuje se však suplementace volnými aminokyselinami, protože dochází k jejich rychlému rozkladu v bachoru přežvýkavců. Využívají se tzv. ruminálně chráněné aminokyseliny, u kterých je díky chemickým nebo fyzikálním úpravám (např. obalení polymerem) zabráněno degradaci a jsou tak absorbovány až ve střevě. [37]

Rogers et al. (1987) zkoumal účinnost ruminálně chráněného methioninu a lysinu na dojnících, jejichž krmné dávky byly založeny na kukuřici. V porovnání s kontrolní skupinou došlo ke zvýšení obsahu proteinu v mléce a mírně i produkce mléka. [38] Doplnění stravy na bázi sóji těmi samými aminokyselinami se neodrazilo ve výtěžcích mléka a proteinů, procento bílkovin v mléce však bylo vyšší. [39]

Armentano (1993) krmil krávy směsí ruminálně chráněného methioninu a lysinu. V časně a střední fázi laktace se koncentrace mléčných proteinů (hlavně kaseinu) zvýšila o 1 g/kg mléka. Výtěžek proteinů na počátku laktace také vzrostl o 37 g/den, v dalších fázích už změny výtěžku nebyly tak zřetelné. [40]

Energetická hodnota krmných dávek

Pro syntézu bílkovin z aminokyselin je dále velmi významná energetická složka krmiva. Nedostatek energie vede k poklesu výtěžku mléka i obsahu bílkovin. Naopak zvýšením energie krmných dávek může být dosaženo i větší koncentrace mléčných proteinů. [41]

Podle Emeryho (1978) obsah bílkovin v mléce vzrůstá o 0,015 % při zvýšení denního příjmu čisté energie o 1 Mcal v případě, že tato energie pochází z obilnin nebo objemného krmiva. Důležitý je tedy nejen dostatek energie, ale také její forma. Pokud je energie krmiva

zvyšována pomocí koncentrátů, obsah proteinů roste také. Naopak přidávání tuku za účelem zvětšit množství energie má negativní dopad na koncentraci mléčných proteinů.

Nejlépe působí na mléčné proteiny energie dodaná ve formě sacharidů (vláknina, škrob) nebo látek schopných zvýšit hladinu krevního cukru. [29] Škrob je obsažen zejména v obilných zrnech. Míra uvolnění energie v batoru závisí na způsobu jeho zpracování. Větší obsah škrobu ve stravě by měl zvyšovat koncentraci bílkovin a snižovat mléčný tuk. V praxi se však při porovnání škrobu se stravitelnou vlákninou neprokázaly žádné výrazné rozdíly. [34]

Také se ukázalo, že náhrada škrobu za rychle stravitelné cukry může působit na obsah tuku a proteinů v mléce tím, že přispívá k hromadění degradovaného dusíku v batoru. [24]

Příjem energie se dá ovlivnit i úpravou poměru píce ke koncentrátu. [22] Byla provedena řada studií, které prokázaly, že snížení poměru píce:koncentrát v krmné dávce vedlo k vyššímu výtěžku i obsahu proteinů v mléce. Tuto skutečnost potvrdil ve svém výzkumu Macleod et al. a současně zaznamenal i zvýšení koncentrace laktózy a pokles mléčného tuku. (tab.3) [42]

Tabulka 3: *Vliv poměru píce:koncentrát na složení mléka [42]*

Složení mléka (%)	Poměr píce:koncentrát			
	80:20	65:35	50:50	35:65
Tuk	3,83	3,72	3,68	3,33
Laktóza	5,28	5,33	5,33	5,55
Protein	3,11	3,12	3,22	3,26

Příjem tuku ve stravě

Jakmile se začal v krmných dávkách dojnic používat doplňkový tuk coby zdroj energie, nastal zjevný pokles v koncentraci mléčných proteinů, zejména kaseinů. I přes nižší obsah proteinů v mléce zůstal jejich výtěžek stejný, popřípadě i narůstal. [27]

Nadbytek tuků obvykle způsobuje redukci mléčných bílkovin. Přidání 4 – 12 % olejů nebo tuků ke krmným dávkám (např. sójový nebo kokosový olej) snížilo obsah mléčných proteinů o 0,1 – 0,3 %. [29]

Důvod tohoto působení není zatím zcela znám, ale předpokládá se, že pro mikroflóru není energie z tuku využitelná, tím klesá syntéza mikrobiálního proteinu i množství aminokyselin dodávaných do mléčné žlázy. Tuk může také přímo zpomalovat růst určitých mikroorganismů. [24]

Jedna ze studií byla zaměřena na to, zda dodatečné zkrmování proteinu při současné suplementaci tukem může zmírnit pokles koncentrace proteinů v mléce. Krmné dávky obsahovaly z 25 % kukuřičnou siláž, z 25 % vojtěšku a z 50 % koncentrát (kukuřičný, sójový šrot nebo extrudovaná sója, vitamíny, minerály). Přidaný tuk a protein pocházel z extrudovaných sójových bobů a šrotu. Produkce mléka při této stravě sice vzrostla, ale množství proteinu a kaseinu klesalo. Protein dodaný v krmivu tedy danému poklesu nedokázal zabránit. [43]

Typ podávaného krmiva

Na koncentraci a výtěžek mléčných bílkovin může mít vliv kvalita a typ krmiva. [34] V jednom výzkumu byly kravám podávány tři typy krmiva: seno, travní siláž a kukuřičná

siláž. Navíc byla dieta doplněna koncentrátem z ječmene, sójové moučky a močoviny, aby byly pokryty požadavky dojníc. Všechny dávky byly shodné v obsahu dusíku a energie. Krávy krmené travní siláží měly nejvíce mléka, ale zároveň nejnížší obsah proteinů a kaseinů. Nejvíce bílkovin a také tuku bylo v mléce krav krmených kukuřičnou siláží. [44] V další podobné studii bylo stádo rozděleno do tří skupin. První skupina spásala žitnou travu a bílý jetel, u druhé skupiny byla pastva doplněna 2 – 3 kg kukuřičného zrna a poslední skupina přijímala kromě píce ještě 5 – 6 kg kukuřičného zrna a 3 – 4 kg siláže. Mléko ze skupiny 3 mělo o něco vyšší podíl kaseinů, hlavně β -CN. Nejvyšší výtěžky mléka byly také u dojníc ze třetího stáda, nejnižší u prvního stáda, které mělo naopak vyšší výtěžky tuku. Náhrada píce za kukuřici nebo siláž tedy zvýšila výtěžek mléka, ale měla jen malý vliv na složení bílkovin. [45]

2.3.4 Vliv výživy na obsah a složení mléčného tuku

Obsah tuku v mléce lze ovlivnit výživou poměrně jednoduše. V současné době je kladen důraz zejména na redukci mléčného tuku, popřípadě vylepšení jeho nutriční hodnoty změnou profilu mastných kyselin (MK), tzn. snížení obsahu nasycených a zvýšení nenasycených MK. [46]

Produkce mléka s nízkou koncentrací lipidů nasává při zkrmování vysoce koncentrovaných krmiv, při nedostatku vlákniny, nebo pokud dávky obsahují nenasycené MK. [22]

Tuky z potravy podléhají v batoru tzv. biohydrogenaci, což je děj, při kterém batorové mikroorganismy svou činností přeměňují nenasycené MK na nasycené. Vznikající nasycené nebo mononenasycené MK s trans konfigurací opouštějí bator a jejich zvýšená absorpce v tenkém střevě je spojena s poklesem syntézy mléčného tuku. [24,27,47] Biohydrogenace je také příčinou toho, proč zkrmované rostlinné oleje bohaté na nenasycené MK mají jen omezený vliv na kompozici mastných kyselin mléčného tuku. Aby se tomuto procesu zabránilo, jsou užívány chráněné tuky. K těm se řadí olejnatá semena obalená vlastní vnější slupkou, amidy mastných kyselin nebo formaldehydem ošetřené lipidy. [27,47] Díky nim mohou být polynenasycené MK absorbovány až ve střevě a začleněny do mléčného tuku. [48] Doplnky tuků s nízkou ochranou zpomalují trávení vlákniny v batoru, snižují produkci acetátu a tím i výtěžky mléka a obsah mléčného tuku. [47,49]

Byla zkoumána možnost snížení cholesterolu a zvýšení hladiny nenasycených MK mléčného tuku při stejných výtěžcích mléka. Krávám byly ke krmivu přidány nízké dávky lněného semena a směs stopových minerálních prvků. U pokusné skupiny ve srovnání s kontrolní byl na konci experimentu naměřen v mléce o 32 % nižší obsah cholesterolu, o 15 % vyšší koncentrace nenasycených a o 8 % nižší koncentrace nasycených MK. Tento postup měl tedy příznivý vliv na kompozici mléčného tuku a zároveň nebyl negativně ovlivněn ani výtěžek mléka, ani obsah mléčných bílkovin. [50]

Prekurzory mléčných lipidů (acetát, betahydroxybutyrát) vznikají převážně fermentací sacharidů ze stravy, takže jejich množství a zdroj zasahují do výtěžků i koncentrace tuku v mléce. [46] Pokles obsahu mléčného tuku nastává také v důsledku příjmu velkého množství obilnin bohatých na škrob. [49]

2.3.5 Nutriční vlivy na obsah laktózy

Koncentraci laktózy v mléce nelze prostřednictvím výživy změnit snadno a dochází k tomu jen při neobvyklých až extrémních podmínkách (podvýživa dojníc). Proběhlo několik experimentů, které se na změnu v obsahu laktózy zaměřily. Jejich výsledky však byly

většinou rozporuplné. [22] Klíčovou látkou pro syntézu laktózy je glukóza, proto byly vyzkoušeny její infuze do duodena. Výtěžek mléka sice vzrostl, ale obsah laktózy se významně nezměnil. [51] Přidání tuku ke stravě dojníc v některých případech vedlo k poklesu koncentrace laktózy. [52,53]

2.3.6 Vliv výživy na koncentraci vitaminů a minerálních látek

Vitamíny B tvoří mikroorganismy v batoru a není tedy potřeba je dodávat. Výživou lze množství produkovaných vitaminů pozitivně ovlivnit, zejména zkrmováním kvalitně prokvašených siláží. Lze změnit také koncentraci vitaminů A, D a E. Na obsah vitaminu C strava nepůsobí.

Koncentrace základních minerálních látek mléka (př. Ca, P, Mg, K, Cl) je obvykle geneticky určena a výživa ji ovlivňuje jen málo. U některých dalších se obsah v mléce může změnit (Zn, Cu, Cr, Mn, Br ad.). Spíše než na množství minerálů v mléce působí jejich nedostatek nebo nadbytek ve stravě na zdravotní stav dojníc a tím i na kvalitu mléka. [41]

2.3.7 Sója jako krmivo

Jako zdroj bílkovin se běžně používají krmiva na bázi sóji. Kromě toho, že je sója výborným zdrojem proteinů, vlákniny a mnoha stopových prvků, má také významný obsah isoflavonů. Sójové boby se často termicky upravují (nejefektivnější je extruze), aby došlo k odstranění vlhkosti a nežádoucích antinutričních látek. [54] Současně se také zvýší obsah proteinu, který není v batoru degradován a tím se umožní jeho větší využití. [55]

Isoflavony

Jsou nejpočetnější skupinou látek zvaných fytoestrogeny. Ty jsou definovány jako látky rostlinného původu, které mají schopnost aktivovat estrogení receptory u savců. Je to dáno určitou strukturní nebo funkční podobností se savčím estrogenem.[56] Isoflavony se vyskytují hlavně v luštěninách (cizrna, fazole mungo), jetelových a vojteškových výhoncích. [57,58] Z nutričních zdrojů isoflavonů jsou nejvýznamnější sójové boby. Obsahují přibližně 1–3 mg na 1 g proteinu.

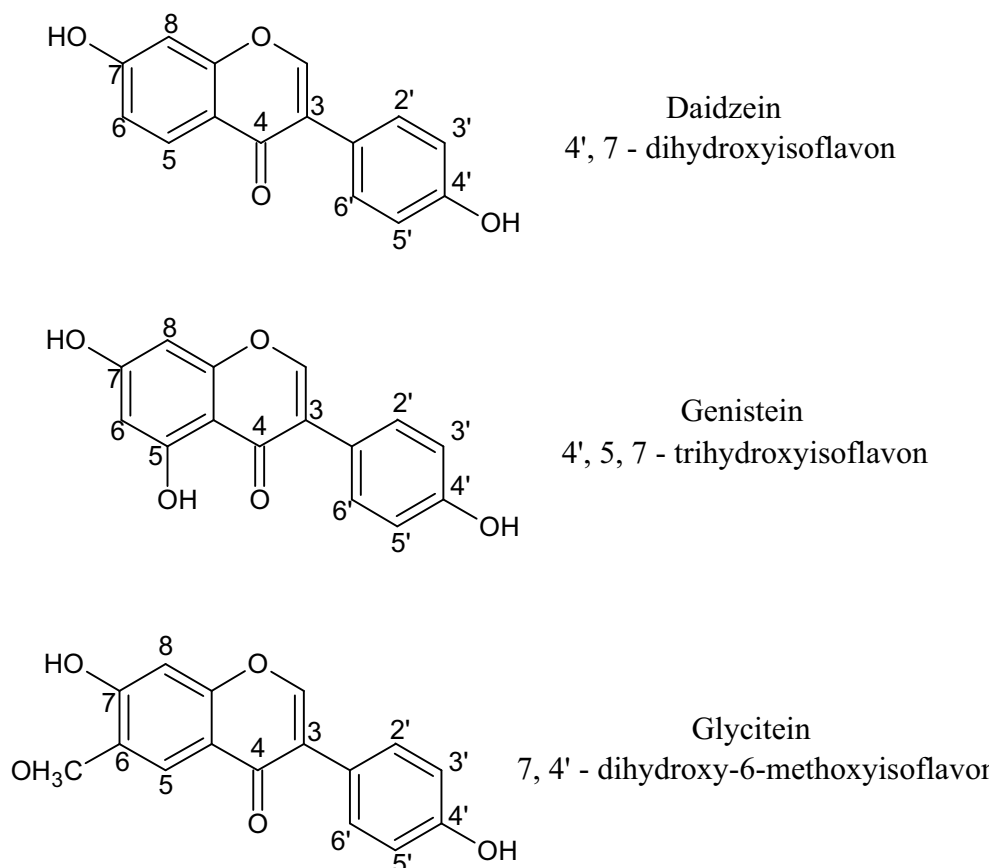
Hlavními isoflavony jsou genistein, daidzein a glycitein ze sóji a biochanin A a formononetin z červeného jetele. V poslední době je isoflavonům věnována velká pozornost, je zkoumána hlavně jejich možná úloha při prevenci a léčbě mnoha chronických onemocnění, včetně některých typů rakoviny, srdečních onemocnění, osteoporózy a dále při zmírnění příznaků menopauzy. [59]

Sójové isoflavony

Patří do rozsáhlé skupiny flavonoidů. Základem struktury je flavonové jádro, které se skládá ze dvou benzenových kruhů spojených přes heterocyklický pyran (obr.3). Hlavní isoflavony v sójových bobech jsou genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavon) a daidzein (4',7-dihydroxyisoflavon). V menším množství potom glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxyisoflavon). [59]

Genistein a daidzein patří k nejprostudovanějším fytoestrogenům. Jsou metabolizovány z rostlinných prekurzorů biochaninu A a formononetinu. V rostlinách se vyskytují v neúčinné formě jako glykosidy genistin a daidzin, ve střevech se mění deglykosylací na aglykony genistein a daidzein, které jsou snáze absorbovány střevní stěnou a jejich estrogení aktivita

se mnohokrát zvýší. Střevní mikroflóra metabolizuje daidzein na equol nebo O-demethylangolensin a genistein na p-ethylfenol. [60]



Obr.3: *Struktura některých sojových isoflavonů* [59]

Vliv fytoestrogenů na lidské zdraví

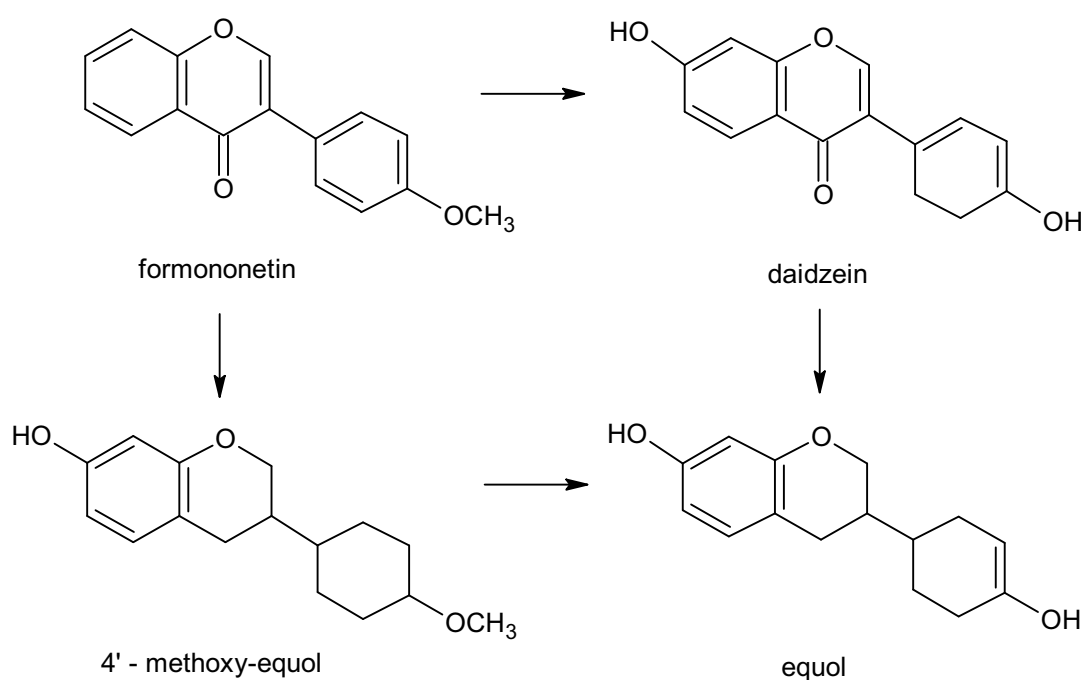
Proběhla spousta klinických studií, které se zabývaly potenciálními zdravotními účinky fytoestrogenů. Konzumace stravy bohaté na fytoestrogeny má očividně na lidský organismus spíše prospěšný než škodlivý vliv. Obzvláště při ochraně proti některým častým nemocem, které souvisí s hormonální aktivitou – rakovina prsu u žen, rakovina děložní sliznice, prostaty, tlustého střeva, konečníku, žaludku nebo plic a dalším nenádorovým onemocněním – osteoporóza, příznaky postmenopauzy a srdeční choroby. [61]

Účinek fytoestrogenů na zvířata

V roce 1946 odhalil veterinář Henry Bennets příčiny onemocnění (tzv. jetelová nemoc), které způsobovalo u ovcí ztrátu plodu nebo neplodnost. Přišel na to, že isoflavonoid formononetin obsažený v jeteli se prostřednictvím střevních mikroorganismů přeměňuje až na equol (obr.4), který působí jako estrogen a právě nadbytek estrogenů ovčím škodí. [58,62]

Neplodnost může být dočasná nebo i trvalá, pokud byly ovce vystaveny estrogenům po delší dobu. [62]

V Číně byl v posledních deseti letech zkoumán vliv isoflavonů (zejména daidzeinu) na hospodářská zvířata. V bachoru přežvýkavců jsou isoflavony metabolizovány prostřednictvím mikroorganismů. Mikrobiální aktivita a metabolismus v bachoru závisí na hladině testosteronu v krvi. Účinek isoflavonů spočívá v tom, že hladinu testosteronu v krvi a v bachoru zvyšují, tím pádem mohou ovlivnit mikroflóru. U selat byl pozorován pozitivní vliv na růst střevní mikroflóry. Byly prokázány i účinky na růst samců a imunitní systém prasat, ptáků a krys. Další pokusy u krys a prasat ukázaly, že daidzein působí na rozvoj mléčné žlázy a laktaci a u ptáků podporuje kladení vajec. Tyto látky tedy mají velký potenciál pro budoucí užití v doplňcích výživy pro zvířata. [56]



Obr.4: *Průběh metabolismu formononetinu v bachoru* [62]

2.4 Metody kapilární elektroforézy pro stanovení kaseinů

Pro analýzu proteinů mléka je s úspěchem používána kapilární elektroforéza. Tato metoda má oproti tradičním separačním technikám mnoho výhod. Především poskytuje rychlou a automatizovanou analýzu s vysokou účinností a vyžaduje jen malé objemy vzorků a rozpouštědel. [63 – 74]

Chen a Tusak (1994) se pokusili separovat mléčné proteiny za méně než 10 minut použitím 0,25 M borátového pufru o pH 10. Separace probíhala v nepokryté křemenné kapiláře (25 cm x 20 μ m i.d.), při teplotě 23 °C a napětí 10 kV. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky a detekovány při 200 nm. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promývána sekvencí 1 M NaOH, vody a základního pufru. U čerstvého odtučněného mléka se frakce β - a α -kaseinu dobře oddělily. U sušeného mléka se objevovaly široké, špatně rozdělené píky v důsledku tepelné denaturace během zpracování. Použitý pufrovací systém

o vysoké iontové síle a vysokém pH umožnil eliminovat agregaci kaseinů a současně zvýšil účinnost separace. [63]

De Jong et al. (1993) použili pro stanovení mléčných bílkovin hydrofilně pokrytou křemennou kapiláru (57 cm x 50 μm i.d.) a 10 mM fosfátový nebo citrátový pufr o nízkém pH (2,5 – 3) s obsahem 6 M močoviny a methylhydroxyethylcelulosity (polymerní aditivum, které pokrývá vnitřní stěnu kapiláry). Tato kombinace zabránila adsorpci proteinů na záporně nabitý povrch kapilární stěny a umožnila tak dobrou separaci všech hlavních mléčných proteinů. Kaseinové micely byly narušeny dithiothreitem (redukční činidlo) přidaným do vzorkovacího pufru a jejich opětovné tvorbě při elektroforéze bránila močovina v základním elektrolytu. Analýza se uskutečnila při teplotě 45 °C, napětí 20 nebo 25 kV, vzorky byly vstříkovány tlakem a UV detekce probíhala při 214 nm. Kapilára byla proplachována směsí methanolu a vody, puftrem a vodou. Touto metodou se kompletně oddělily sérové proteiny a kaseiny, včetně některých genetických variant. [64]

Pro separaci proteinů v čerstvém a sušeném mléce byla navržena rychlá metoda CZE (1997). Byla použita pokrytá kapilára (50 cm x 50 μm i.d.) a následující separační podmínky: teplota 40 °C, napětí 20 kV a 0,05 M fosfátový pufr o pH 2,5 s přídavkem 4 M močoviny a 0,1 % Tween 20. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky nebo elektroforeticky a detekován při 214 nm. α -kasein byl stanoven jako skupina píků mezi 13,97 a 18,24 minutami, β -kasein tvořily píky od 19,86 do 20,76 minuty. κ -kasein se s ostatními kaseiny překrýval. Píky kaseinů v rehydratovaném mléce se jevíly širší, byly v porovnání s čerstvým mlékem hůře rozdělené. Přestože mají kaseiny vysokou tepelnou stabilitu, pozměnil se v důsledku tepelného zpracování u sušeného mléka vzhled elektroferogramu. [65]

V roce 1998 byla zveřejněna další metoda kapilární elektroforézy mléčných bílkovin založená na principu micelární elektrokinetické chromatografie (spojení klasické CZE a chromatografie s hydrofobní interakcí). Před analýzou byly vzorky denaturovány účinkem dodecylsulfátu sodného (SDS) a dithiothreitolu (DTT) a rozpad kaseinových micel byl podpořen zahřátím na 100 °C po dobu 3 minut. Nejlepších separací bylo dosaženo použitím 3 mM borátového pufru (pH 9,5), ke kterému byl přidán SDS s kritickou micelární koncentrací $\text{cmc} = 8,2 \text{ mM}$. Dělení proteinů bylo provedeno v nepokryté kapiláře (27 cm x 20 μm i.d.) při 20 °C a separačním napětí 30 kV, detekce při vlnové délce 214 nm. Po každé analýze byla kapilára proplachována 0,1 M NaOH a 3 mM borátovým puftrem. Touto technikou bylo dosaženo rozdělení kaseinů a syrovátkových proteinů ve velmi krátkém čase (maximálně 2 minuty). [66]

Otte et al. (1997) separoval pomocí CZE nejen jednotlivé kaseiny a některé jejich genetické varianty, ale také hlavní produkty hydrolýzy kaseinu v sýrech. Jeho záměrem bylo aplikovat poupravenou de Jongovu metodu (1993) k identifikaci kaseinů. Používala se buď hydrofilně pokrytá kapilára (43 cm x 50 μm i.d.) nebo nepokrytá kapilára (60 cm x 50 μm i.d.). Vzorky byly rozpuštěny ve fosfátovém pufru o pH 8 s obsahem 8 M močoviny a 10 mM dithioerythritol (DTE). Po hodině při pokojové teplotě byly vzorky pro analýzu zfiltrány přes 0,45 μm mikrofiltr. Základní elektrolyt obsahoval 10 mM dihydrogenfosforečnan sodný, 6 M močovinu a 0,05 % hydroxypropyl methyl celulosu (HPMC). Hodnota pH pufru byla 2,5. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky, separovány při konstantním napětí 14 kV

a detekovány při 214 nm na UV detektoru. Pík α_{S2} -kaseinu se objevil ve 20. minutě, α_{S1} -kasein asi ve 22. minutě a β -kasein ve 25. minutě. κ -kasein byl pravděpodobně pík ve 24,5 minutě. Elektroferogramy sýrů (feta, danbo, mozzarella) byly o něco složitější, byla detekována i řada hydrolytických produktů. Touto metodou byly dobře stanoveny kaseiny v mléce, sýrech a mohla být sledována proteolýza sýrů. [67]

Skupina vědců ze Španělska a Německa (2001) se pokusila rozvinout rychlou metodu CE pro souběžné stanovení syrovátkových proteinů, kaseinů a jejich degradačních produktů (para- κ -kasein) v mléce a mléčných produktech. Účinnost a rychlost separace proteinů byla studována v závislosti na pH, iontové síle a koncentraci močoviny v elektrolytu a na separačním napětí. Elektroforéza probíhala v hydrofilně pokryté křemenné kapiláře (60 cm x 50 μ m i.d.), při napětí 25 nebo 30 kV. Hydrodynamicky dávkované vzorky byly detekovány při 214 nm. Před každou analýzou byla kapilára promývána elektrolytem po dobu 6 minut. Do vzorkovacího pufru (pH 8,5 \pm 0,1) byl použit 167 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan, 42 mM 3-morfolino-propansulfonová kyselina, 67 mM disodná sůl kyseliny ethylendinitrilotetraoctové, 17 mM DTT, 8 M močovina a 0,5 g/l MHEC. Elektrolyt byl tvořen roztokem kyseliny citronové a citrátu trisodného v močovíně o různé koncentraci a pH. Pufry byly přefiltrovány přes 0,45 μ m mikrofiltr. Pro kvantitativní analýzu se jako nejlepší jevil pufr s 4,8 M močovinou o pH 2,3 a napětí 25 kV. Jeho použitím se proteiny a produkty hydrolyzy v sýru rozdělily do 30 minut (α -CN 21 – 24 min., κ -CN 26 min., β -CN 27 – 30 min.). [68]

Další vědecká skupina z USA (2001) popsala metodu CZE pro kvalitativní a kvantitativní analýzu bílkovin a peptidů ve vzorcích mléka a sýra. Základní pufr s pH 3,3 se skládal ze 4 M močoviny, 20 mM citrátu sodného, 10 mM fosfátu sodného a 0,1 % HPMC. Vzorky byly dávkovány tlakem a děleny při teplotě 38 °C v hydrofilně pokryté kapiláře (57 cm x 75 μ m i.d.). Detekce probíhala při 214 nm. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promývána 2 minuty pufrem. Pro dosažení ostřejších píků byla iontová síla vzorků udržována na nižší hodnotě než u elektrolytu. [69]

Technika CE byla použita pro analýzu kaseinových frakcí ve směsích kravského, kozího a ovčího mléka. (1999). Ze směsi mléka byl působením HCl při pH 4,6 izolován kasein. Používala se opět hydrofilně pokrytá kapilára (57 cm x 50 μ m i.d.) a aplikované napětí bylo 25 kV. Elektrolyt měl pH 3 a skládal se z 0,32 M kyseliny citrónové, 20 mM citrátu sodného, 6 M močoviny a 0,05 % MHEC. Před použitím byl pufr zfiltrován (0,22 μ m). Proběhla detekce při 214 nm. U kravského mléka bylo migrační pořadí kaseinů následující: α_{S2} -CN < α_{S1} -CN < α_{S0} -CN < κ -CN < β -CN. Hlavní kaseiny u kozího a ovčího mléka si toto pořadí zachovaly. Ve směsi mléka se lišily migrační časy α_{S2} -CN, α_{S1} -CN, κ -CN a β -CN jednotlivých druhů. Procentuální složení směsi mléka bylo zjišťováno pomocí multivariační regresní analýzy. Prostřednictvím uvedené techniky lze předpovědět složení směsi mléka několika druhů a případně zjistit podvodné přidávání kravského mléka do mlék jiných druhů kvůli nižší ceně. [70]

Byla popsána technika CE pro sledování kaseinů a jejich hydrolyzátů (1994). Z mléka byl připraven kyselý kasein a dále působením chymosinu hydrolyzáty. Separace se konala v nepokryté kapiláře (60 cm x 75 μ m i.d.) při napětí 10,5 kV, vzorky byly dávkovány tlakem

a detekce se prováděla při 214 nm. Jako elektrolyt se použil roztok 0,1 M fosforečnanu sodného a 4 M močoviny, pH 7,3. Pufr byl zfiltrován přes 0,45 μm filtr. Vzorky kyselého kaseinu byly rozpuštěny ve vzorkovacím pufru s následujícím složením: 0,1 M fosforečnan sodný, 7 M močovina a 10 mM DTE. Došlo k dobré separaci jednotlivých kaseinových frakcí (pořadí bylo κ -CN, β -CN, $\alpha_{\text{S}2}$ -CN, $\alpha_{\text{S}1}$ -CN). Sledovala se také hydrolýza $\alpha_{\text{S}1}$ -CN chymosinem při pH 6,2 v různých časech. U $\alpha_{\text{S}1}$ -CN došlo po 4 hodinách k úplné hydrolýze na nízkomolekulární peptidy. $\alpha_{\text{S}2}$ -CN hydrolýze nepodlehl a u β -CN probíhalo štěpení velmi pomalu. Ukázalo se, že CE může být úspěšně využívána pro sledování hydrolytických změn kaseinů a vzniklých peptidů v sýrech a dalších mléčných produktech. [71]

V roce 2003 se pokusil vědecký tým ze Španělska optimalizovat podmínky pro dělení kaseinů kravského mléka. Na směsi proteinů se testovaly různé parametry pro pH pufru, napětí a koncentraci polymerního aditiva. Neoptimálnější separace probíhala při užití 50 mM fosfátového pufru s obsahem 6 M močoviny a 0,05 % HPMC, pH 3, napětí 18,5 kV a teplotě 23 °C. Vzorky kaseinu byly rozpuštěny ve vzorkovacím pufru s přídavkem 8 M močoviny a 10 mM DTT o pH 8. Použil se Beckman P/ACE System 2200 a křemenná kapilára (57 cm x 50 μm i.d.). Vzorky byly vstříkovány hydrodynamicky a detekovány při 214 nm. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára postupně promývána deionizovanou vodou (2 min), 0,03 – 1 M roztokem NaOH (2 min), dusíkem (2 min) a základním elektrolytem (4 min). V použitých podmínkách se podařilo dobře rozdělit jednotlivé kaseiny, některé jejich genetické varianty i různě fosforylované stavy. [72]

K separaci mléčných proteinů byla využita i kapilární elektrochromatografie (2003), která kombinuje techniku HPLC a CE. Jako stacionární fáze sloužily DNA oligonukleotidy a mobilní fází byl 10 mM fosfátový pufr o pH 7,3. Dělení probíhalo na přístroji Beckman P/ACE 5000 CE s UV detekcí při 280 nm a teplotě 25 °C. Používala se kapilára nepokrytá nebo pokrytá oligonukleotidem DNA (47 cm x 75 μm i.d.). Vzorky byly do kapiláry dávkovány pod nízkým tlakem po dobu 5 s a děleny při napětí 15 kV. Byly analyzovány směsi proteinových standardů i odstředěné kravské mléko. Kaseiny byly detekovány v pořadí β -CN, α_{S} -CN, κ -CN, jejich píky byly dobře rozlišeny. Nejrychlejší separace proběhla do 40 minut v nepokryté kapiláře. [73]

Další rozšířenou elektroforetickou metodou je kapilární izotachofóréza. Byla použita k analýze proteinů v roce 2006. Provádí se v diskontinuálním elektrolytickém systému složeného z vedoucího (LE – leading electrolyte) a koncového elektrolytu (TE – terminating electrolyte). Kombinací se zónovou elektroforézou se silně zvýší citlivost i účinnost separace proteinů. Analýza probíhala v jedné kapiláře, v prvním kroku se provedla ITP, která slouží k prekoncentraci analytu a následně se vykonala separace pomocí CZE. Tato technika se označuje jako přechodná izotachofóréza (t-ITP – transient isotachopheresis). Vzorek pro analýzu byl připraven rozpuštěním odstředěného mléčného prášku v destilované vodě na koncentraci 3 % (m/m). Roztok byl zcentrifugován a přefiltrován přes 0,45 μm filtr. Experiment proběhl na přístroji HP^{3D}CE při separačním napětí 30 kV. Jako pufr byl použit nosný amfolyt o pH 3,5. Křemenná kapilára (50 cm x 50 μm i.d.) byla pokrytá hydroxypropylcelulosou. Vzorek byl vstříkován hydrodynamicky a detekován při 222 nm. Nepodařilo se však rozlišit všechny píky patřící kaseinům. [74]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

3.1.1 Používané přístroje

- analytické váhy AND GR-202-EC s citlivostí 0,1 mg, A&D Instruments Company LTD, Tokyo, Japonsko
- pH/mV/ion metr MPH 372, Monokrystaly s.r.o., Turnov, Česká republika
- kombinovaná pH elektroda, typ 01-29 a typ 01-33, Monokrystaly s.r.o., Turnov, Česká republika
- třepačka zkumavek YelloLab, TTS 2, IKA Werke GmbH&Co.KG, Staufen, Německo
- ultrazvuková vana K-5, Kraitex s.r.o., Podhájska, Slovensko
- vakuová/tlaková pumpa, Barnant Co., Barrington, IL, USA

Separace a analýza vzorků byla provedena automatizovaným systémem PrinCE Autosampler ve spojení s UV detektorem:

- PrinCE 460 Autosampler - programovatelný vstřikovač pro kapilární elektroforézu, verze 0.3, PrinCE Technologies B.V., Emmen, Nizozemí
- nízkotlaký dávkovač vzorku 50 – 2000 mBar (5 – 200 kPa)
- spektrofotometrický UV/VIS detektor Spectra SYSTEM UV2000 s deuteriovou a wolframovou lampou, Thermo Separation Products Inc., San Jose, USA
- křemenná kapilára nepokrytá, celková délka 96 cm, efektivní délka 71 cm, vnitřní průměr 50 µm, MicroSolv Technology Corporation, Long Branch, NJ, USA
- softwarové vybavení:
 - WinPrinCE, verze 6.0, Windows PC control for PrinCE, PrinCE Technologies B.V., Emmen, Nizozemí
 - CSW - chromatografická stanice pro Windows, verze 1.7, DataApex, s.r.o., Praha, Česká republika

3.1.2 Používané pomůcky

- klasické laboratorní sklo a pomůcky
- vialky 0,5 ml, 4 ml, 40 ml, Supelco/Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA
- jednorázové mikrofiltry Minisart RC s regenerovanou celulosovou membránou, průměr 17 mm, velikost pórů 0,45 µm, Sartorius AG, Goettingen, Německo
- mikropipeta Biohit 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl, Biohit Proline, Helsinky, Finsko
- injekční stříkačky LUER – 2, 5, 10 ml, Chirana T. Injecta, a.s., Stará Turá, Slovensko
- mikrostříkačka Hamilton 100 µl, HAMILTON COMPANY, Reno, NV, USA
- selektivní indikátorové papírky pH 3,9 – 5,4, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika

3.2 Chemikálie a vzorky

3.2.1 Používané chemikálie

- destilovaná voda
- voda pro HPLC
- α _S-kasein z kravského mléka, 70%, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo
- β -kasein z kravského mléka, 90%, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo
- κ -kasein z kravského mléka, 80%, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo
- dihydrogenfosforečnan sodný, Lachema, s.p., Brno, Česká republika
- močovina, 99,5% p.a., Lachema, s.p., Brno, Česká republika
- hydroxypropyl-methyl-celulosa, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- kyselina orthofosforečná, 85%, Lachema, a.s., Neratovice, Česká republika
- hydroxid sodný, Lachema, s.p., Brno, Česká republika
- HEPPS (N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[3-propansulfonová kyselina]), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo
- DL-dithiothreitol, 99%, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo
- kyselina octová, 99,8% p.a., Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika
- mesityloxid, Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo
- aceton CHROMASOLV pro HPLC, Riedel-de-Haën, Seelze, Německo
- kyselina chlorovodíková, 35%, Lachema, a.s., Neratovice, Česká republika

3.2.2 Vzorky mléka

Byla analyzována mléka dostupná v běžných obchodních sítích:

- Tatra – trvanlivé plnotučné mléko (3,5 % tuku), UHT, homogenizované. Mlékárna Hlinsko, s.r.o., Hlinsko v Čechách, ČR
- Vian – trvanlivé polotučné mléko (1,5 % tuku), UHT, homogenizované. Mlékárna Hlinsko, s.r.o., Hlinsko v Čechách, ČR
- Euro shopper – trvanlivé odtučněné mléko (0,5 % tuku), UHT, homogenizované. AHOLD Czech Republic, a.s., Říčany u Prahy, ČR
- Lipánek – dětské polotučné mléko (1,5 % tuku), UHT, homogenizované, MADETA a.s., České Budějovice, ČR
- Jihočeské mléko polotučné čerstvé (1,5 % tuku), vysokotepečně pasterizované, MADETA a.s., České Budějovice, ČR
- Via Natur – selské bio mléko čerstvé (3,5 % tuku), pasterizované, homogenizované. OLMA a.s., Olomouc, ČR
- Laktino – sušené mléko polotučné (14 hmot.% tuku), z pasterizovaného mléka sušeného v proudu horkého vzduchu, PML Protein. Mléko. Laktóza, a.s. Nový Bydžov, ČR

Vzorky lyofilizovaného mléka dodal Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Oddělení fyziologie výživy zvířat, pracoviště Pohořelice. Tyto vzorky pocházely od 4 holštýnských dojnic rozdělených do 2 skupin (pokusná a kontrolní).

Dojnice byly krmeny individuálně 2x denně (v 7:00 a 17:00) ad libitum krmnou dávkou složenou z kukuřičné siláže, lučního sena a doplňkové krmné směsi.

Pokusná skupina dojnic byla krmena doplňkovou krmnou směsí na bázi plnotučné extrudované sóji, u kontrolní skupiny byly základem doplňkové krmné směsi extrudované řepkové pokrutiny.

3.3 Použité pracovní postupy

Příprava roztoků základních elektrolytů

Pro analýzu kaseinů metodou CZE byl podle literatury [64] zvolen jako základní elektrolyt 10 mM fosfátový pufr. Ten byl připraven rozpuštěním 89,7 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 25 mg hydroxypropyl-methyl-celulosy v 37,5 ml 8 M močoviny. Pomocí 4 M kyseliny orthofosforečné bylo na pH metru nastaveno pH 2,5 a roztok doplněn vodou na objem 50 ml.

Příprava redukčních pufrů

Byly testovány celkem tři redukční pufrы. Jejich základem bylo vždy 50 ml 0,25 M Tris. První redukční pufr obsahoval pouze 0,25 M Tris (1,5138 g Trisu rozpuštěno v 50 ml vody). U druhého redukčního pufru bylo k 50 ml 0,25 M Tris přidáno 77,1 mg DTT. Poslední pufr obsahoval 77,1 mg DTT a navíc 24,024 g močoviny. Pomocí koncentrované HCl bylo pH všech pufrů upraveno na hodnotu 8,8.

Příprava standardních roztoků

Rozpuštěním standardů jednotlivých kaseinů ve zředěném redukčním pufru (redukční pufr/voda = 1 : 1) byly připraveny standardní roztoky o koncentraci 2 mg/ml.

Dále byly stejným postupem přichystány směsné standardy všech tří kaseinů o koncentracích 2 mg/ml, 4 mg/ml a 6 mg/ml.

Před analýzou byly standardní roztoky inkubovány minimálně 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně filtrovány přes 0,45 μm filtr.

Postup izolace kaseinů z mléka

Vzorky lyofilizovaného mléka o hmotnosti 0,39 – 0,41 g byly rozpuštěny ve 4 ml vody pro HPLC o teplotě 40 °C. Rozpuštění bylo podpořeno ponořením do ultrazvukové lázně temperované na 40 °C na dobu 30 minut. Poté byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu.

Vzorky sušeného mléka (cca 0,5 g) byly rozpuštěny v 5 ml vody a ponechány půl hodiny při laboratorní teplotě.

K mléku (5 ml klasického a sušeného, 4 ml lyofilizovaného) byla za stálého míchání přidávána po kapkách 10% kyselina octová (150 - 300 μl) až k isoelektrickému bodu - pH 4,6, čímž došlo k precipitaci kaseinů.

Vzorky byly ponechány přibližně hodinu při laboratorní teplotě pro vysrážení co největšího množství kaseinů a poté přefiltrovány za sníženého tlaku. Sraženina kaseinů na fritě byla třikrát promyta 10 ml acetonu, aby došlo k odstranění tuku. Získaný kasein byl vysušen a použit pro analýzy.

Příprava roztoků vzorků

5 – 10 mg izolovaného kaseinu bylo rozpuštěno v 1 ml zředěného redukčního pufru (redukční pufr/voda = 1 : 1) a 1 hodinu inkubováno při laboratorní teplotě. Před samotnou analýzou byl vzorek přefiltrován přes 0,45 µm filtr.

Obecný pracovní postup při analýzách

Na začátku dne byla kapilára promývána 1 hodinu základním elektrolytem a po skončení všech analýz 15 minut HPLC vodou. Víčka vialek byla každý den vyměňována, protože na nich docházelo ke krystalizaci močoviny ze základního elektrolytu.

Všechny používané roztoky a vzorky byly filtrovány přes 0,45 µm filtr. Analýzy probíhaly při teplotě 30 °C. První analýza v daný den byla vždy pouze zkušební.

3.4 Vybrané validační parametry

Linearita odezvy detektoru

Je zjišťována na základě sestrojených kalibračních závislostí a podle korelačních koeficientů.

Opakovatelnost migračních časů a ploch píků

Je vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou RSD:

$$RSD = \frac{S \cdot 100}{x} (\%) \quad (1)$$

S – směrodatná odchylka opakovatelnosti z n stanovení

x – průměrná hodnota z n stanovení

n – počet stanovení

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Volba separačního systému

Základní elektrolyt byl zvolen na základě literární rešerše. Byl používán 10 mM fosfátový pufr s hodnotou pH 2,5. Optimalizace zahrnovala snahu zmírnit problémy související s adsorpcí proteinů na stěnu kapiláry. Pro omezení této situace byla u základního elektrolytu použita kombinace nízkého pH (2,5) a přídavku polymerního aditiva (HPMC). Při této hodnotě pH má vnitřní povrch kapiláry v důsledku protonace nulový náboj, což redukuje elektrostatické interakce s proteiny. Také HPMC pokrývá stěnu kapiláry, čímž omezuje zbytkový náboj. Za těchto podmínek byla adsorpce proteinů na kapiláru do značné míry eliminována.

Pro všechny separace byla používána nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm a celkové délce 96 cm (efektivní délka 71 cm). Pro ověření funkčnosti kapiláry byl k některým analýzám přidán marker elektroosmózy mesityloxid.

Při volbě optimálních podmínek byly testovány tři redukční pufry. Byl zvolen ten, ve kterém došlo k nejlepšímu rozlišení píků. Dále bylo voleno separační napětí a doba nástřiku vzorku. Optimalizace byla testována na standardních roztocích kaseinů.

Vybraný separační systém byl nejdříve ověřen na jednotlivých standardech, poté na směsném standardu kaseinů (viz kapitola 4.2 - obr.10,11,12,13).

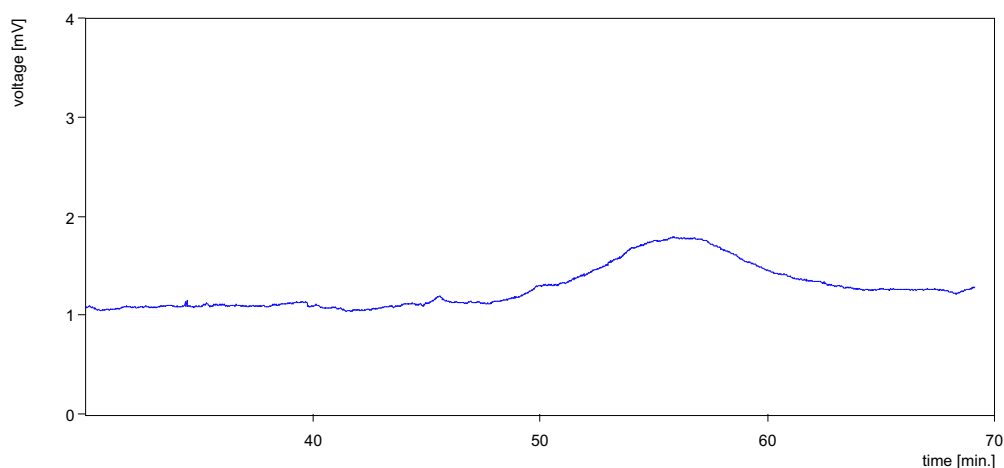
4.1.1 Výběr redukčního pufru

Před CE analýzou byly standardy a vzorky rozpuštěny v redukčním pufru, díky kterému došlo k disociaci kaseinů. Vhodný redukční pufr byl testován na κ -kaseinu.

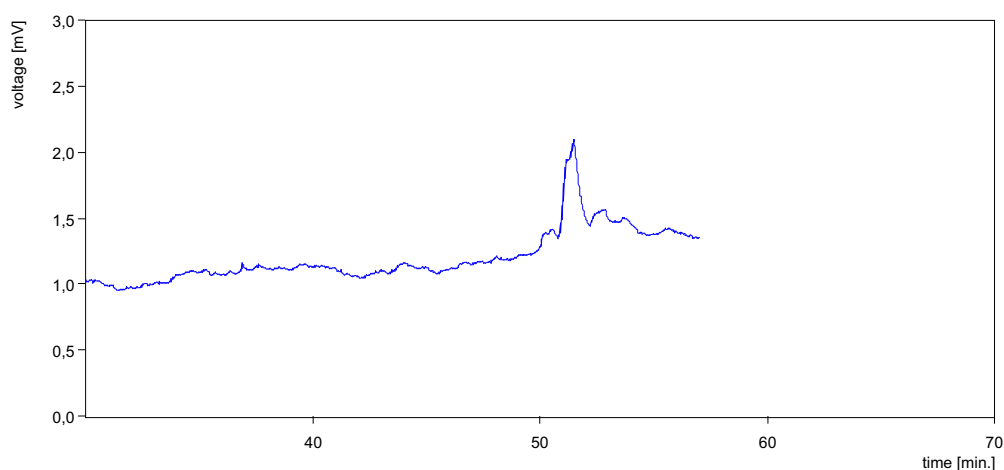
κ -CN byl postupně rozpuštěn ve třech redukčních pufrech s různým složením a poté analyzován. Složení pufrů uvádí tabulka 4. U všech těchto pufrů bylo pomocí koncentrované HCl upraveno pH na hodnotu 8,8.

Tabulka 4: Složení redukčních pufrů

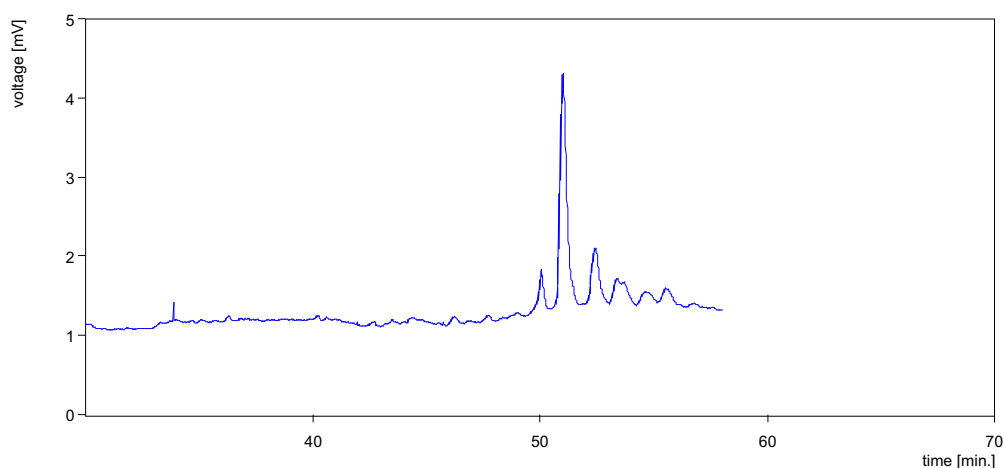
Redukční pufr č.1	0,25 M Tris
Redukční pufr č.2	0,25 M Tris + 10 mM DTT
Redukční pufr č.3	0,25 M Tris + 10 mM DTT + 8 M močovina



Obr.5: κ -CN v redukčním pufru č.1 (0,25 M Tris, pH 8,8)



Obr.6: κ -CN v redukčním pufru č. 2 (0,25 M Tris, 10 mM DTT, pH 8,8)

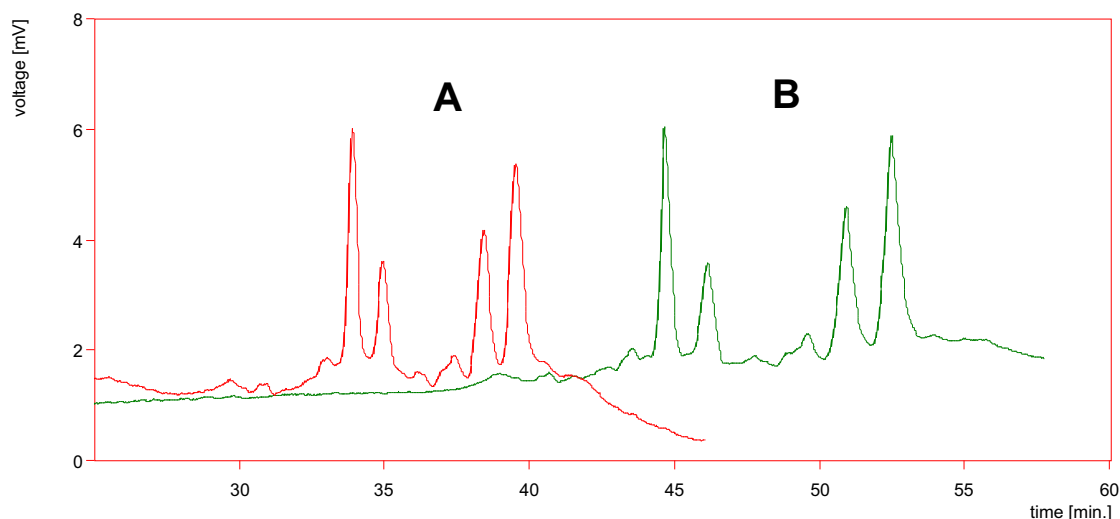


Obr.7: κ -CN v redukčním pufru č.3 (0,25 M Tris, 10 mM DTT, 8 M močovina, pH 8,8)

Z obrázků je patrné, že jen v redukčním pufru č.3 došlo k vytvoření kvalitních píků. Bylo toho dosaženo díky kombinaci DTT a močoviny, jejichž společné působení napomohlo rozrušení kaseinových micel. Úplná redukce kaseinů nastala přibližně po 1 hodině inkubace při laboratorní teplotě, elektroferogram už dále nevykazoval žádné změny. Aby se micely během analýzy opětovně netvořily, byla 8 M močovina přidávána i do základního elektrolytu. Vybraný pufr č.3 byl následně používán při všech dalších analýzách.

4.1.2 Výběr separačního napětí

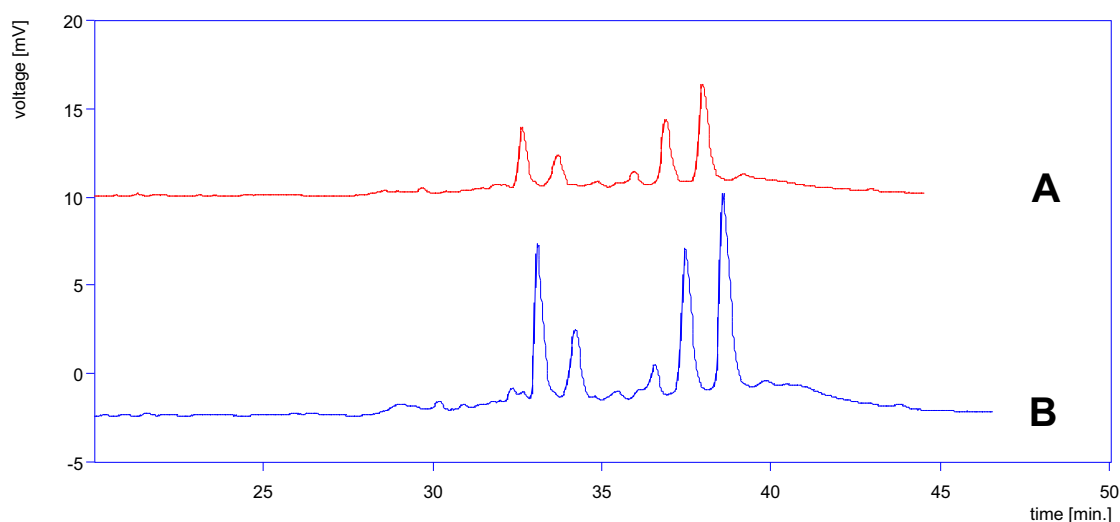
Výchozí separační napětí bylo 25 kV, analýzy za těchto podmínek trvaly až 60 minut. Z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno i vyšší napětí 30 kV. Doba trvání analýzy se tím zkrátila až o 15 minut a píky byly stále dobře rozlišitelné, proto bylo toto napětí aplikováno i při všech dalších separacích (obr.8).



Obr.8: Volba separačního napětí. $A = 30 \text{ kV}$; $B = 25 \text{ kV}$

4.1.3 Volba doby nástřiku

Nástřik vzorků nejdříve probíhal při 5 kPa po dobu 18 s. Doba nástřiku byla snížena při stejném tlaku na 12 s. Píky byly sice dobře oddělené, ale mnohem menší. Čas analýzy zůstal stejný. Byla proto ponechána původní doba nástřiku 18 s (obr.9).



Obr.9: Volba doby nástřiku vzorku. $A = 12 \text{ s}$, 50 kPa ; $B = 18 \text{ s}$, 50 kPa

4.1.4 Optimalizované separační podmínky

Pro analýzu kaseinů byly po optimalizaci metody použity separační podmínky uvedené v tabulce 5.

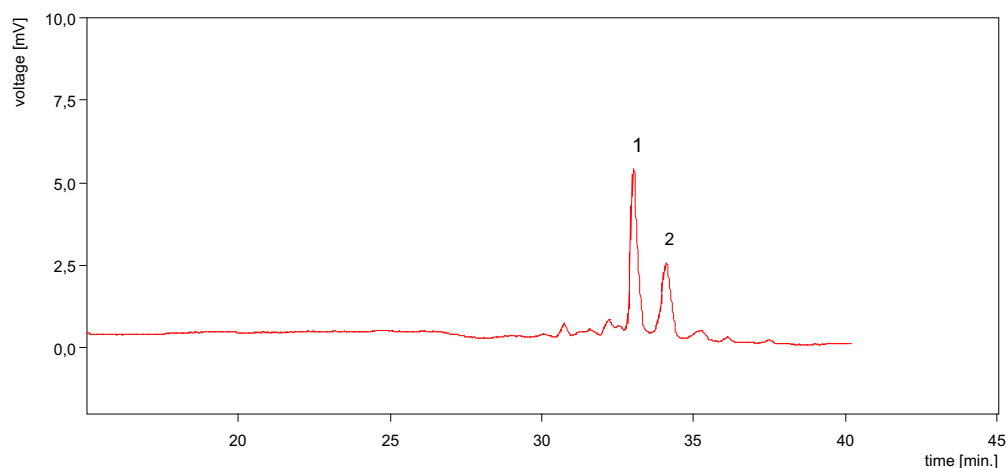
Tabulka 5: *Separační podmínky použité pro analýzu kaseinů*

Základní elektrolyt	10 mM fosfátový pufr s 8 M močovinou a 0,05 % HPMC, pH 2,5
Teplota	30 °C
Dávkování	hydrodynamické, 5 kPa, 18 s
Separační napětí	30 kV
Proud	45 mA
Detekce	UV detekce při 214 nm
Sekvence promývání mezi analýzami	při 150 kPa – voda (1 min.); NaOH (3 min.); voda (3 min.); základní elektrolyt (5 min.)

4.2 Identifikace kaseinů v elektroferogramu

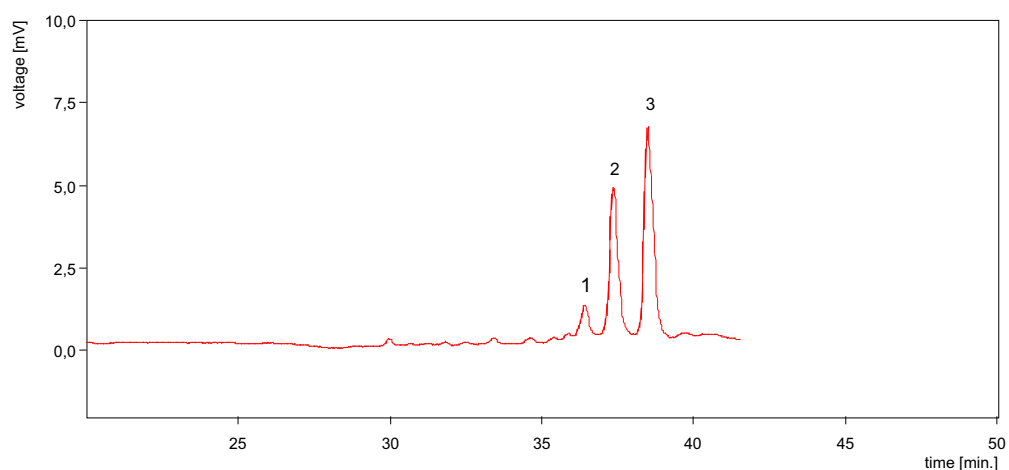
Nejdříve byly analyzovány standardy jednotlivých kaseinů (α_S -, β - a κ -CN) a následně směsný standard, ve kterém byly tyto kaseiny zastoupeny ve stejném poměru. (obr.10,11,12,13)

Jednotlivé varianty a formy kaseinů byly také určeny srovnáním s literaturou. [64,67,68,72]



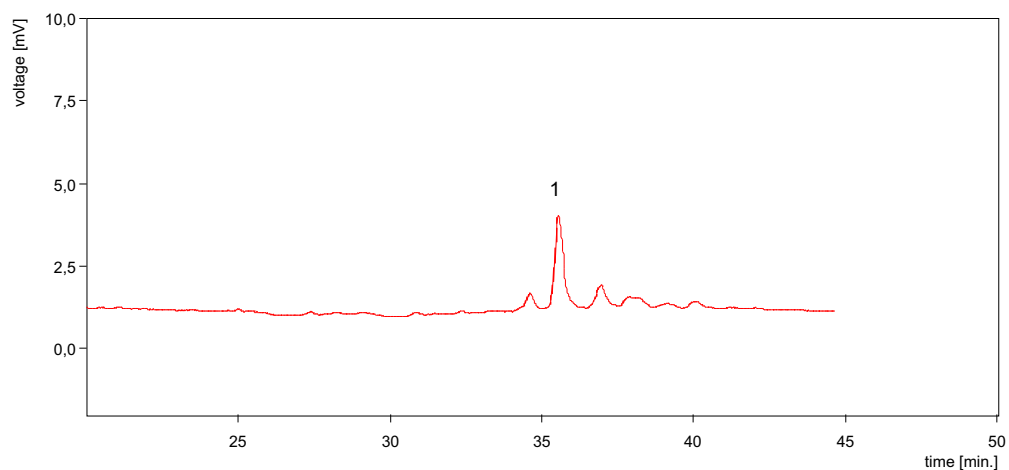
Obr.10: *Elektroferogram standardu α_S -kaseinu. Píky: 1 = α_{S1} -kasein; 2 = α_{S0} -kasein*

α_S -CN tvoří dva dominantní píky. Pík č.1 je α_{S1} -CN, za ním následující píky č.2 je další fosforylovaný stav α_{S1} -kaseinu – tzv. α_{S0} -CN, který obsahuje o 1 fosfátovou skupinu více. Méně výrazné píky před α_{S1} -CN představují α_{S2} -CN (má 4 fosforylované stavy, tj. 10 – 13 fosfátových zbytků). [67,72]



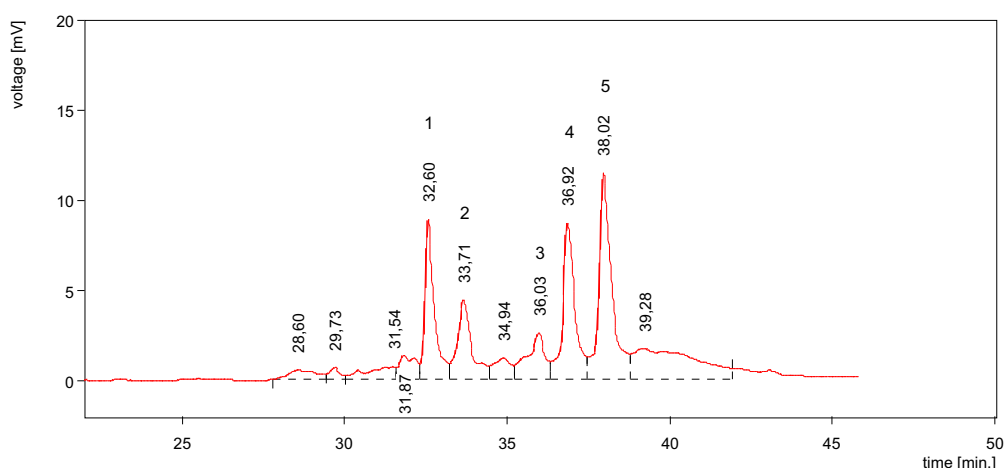
Obr.11: *Elektroferogram standardu β -kaseinu. Píky: 1 = β -CN B; 2 = β -CN A¹; 3 = β -CN A²*

Standard β -CN obsahoval několik genetických variant, převládala forma A¹ a A², menší pík před A¹ pravděpodobně představuje B variantu. [67,72]



Obr.12: *Elektroferogram standardu κ -kaseinu. Píky: 1 = κ -CN*

κ -kasein tvoří jeden dominantní pík, další menší píky mohou představovat jeho glykoformy. [67,72], popř. ostatní kaseiny, protože použitý standard neměl 100% čistotu.



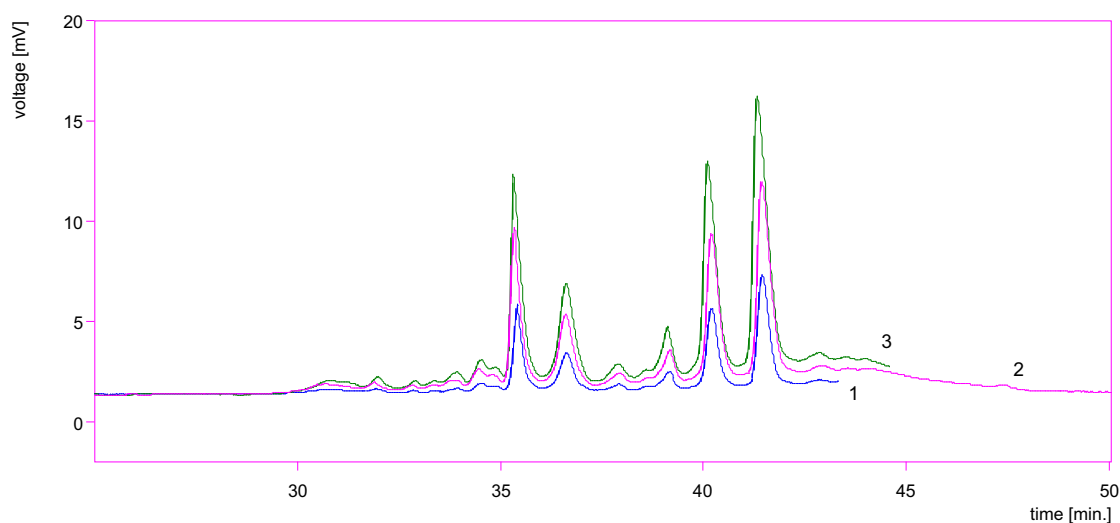
Obr.13: Elektroferogram směsného standardu α_S -, β - a κ -CN (v poměru 1:1:1).

Píky: 1 = α_{S1} -CN; 2 = α_{S0} -CN; 3 = β -CN B; 4 = β -CN A¹; 5 = β -CN A²

Srovnáním s jednotlivými standardy byly určeny i píky kaseinů v jejich směsném standardu. α_S -CN byl identifikován jako skupina píků v časovém rozmezí od 29,73 do 33,71 minut. β -CN je složen ze 3 píků v čase 36,03 až 38,02 minut. U κ -CN došlo zřejmě k překryvu s ostatními píky, jeho pík není v elektroferogramu patrný. Ani při změně daných podmínek – snížení separačního napětí na 25 kV, kratší doba nástřiku (6 – 12 s) – se jeho pík neobjevil. V práci byly tedy vyhodnocovány jen 2 hlavní kaseiny – α_S - a β -CN.

4.3 Sestrojení kalibračních závislostí

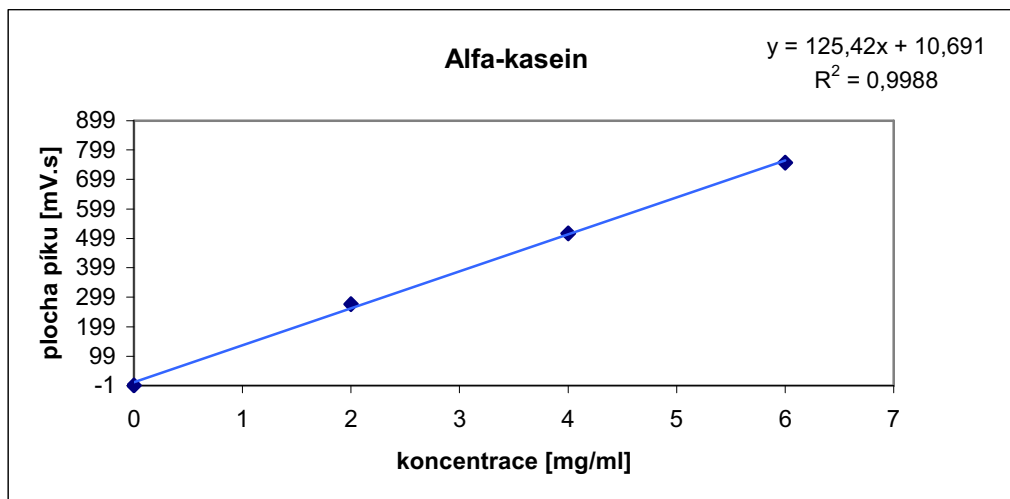
Byla proměřena sada roztoků směsného standardu kaseinů o koncentracích 2 mg/ml, 4 mg/ml a 6 mg/ml (obr.14). Postup přípravy je uveden v kapitole 3.3. Každý standard byl analyzován třikrát. Plocha jednotlivých píků byla zjištěna integrací v programu CSW. Kalibrační křivka α_S - a β -kaseinu, tj. závislost plochy píku na koncentraci analytu, byla sestavena v programu Excel.



Obr.14: Elektroferogramy směsného standardu kaseinů (1:1:1) použité k sestavení kalibračních závislostí. Popis: 1 = 2 mg/ml; 2 = 4 mg/ml; 3 = 6 mg/ml

Tabulka 6: Naměřená data pro sestrojení kalibrační přímky α _S-CN

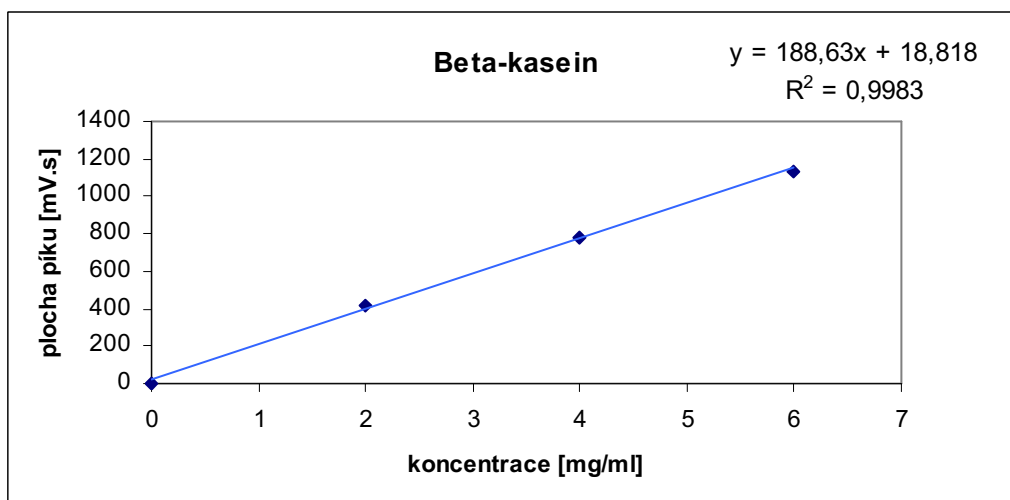
Koncentrace kaseinů [mg/ml]	2	4	6
Plocha [mV.s] – průměr ze 3 měření	275,5607	516,3987	755,8677



Obr.15: Kalibrační závislost α _S-kaseinu

Tabulka 7: Naměřená data pro sestrojení kalibrační přímky β -CN

Koncentrace kaseinů [mg/ml]	2	4	6
Plocha [mV.s] – průměr ze 3 měření	418,3906	785,1608	1135,2715



Obr.16: Kalibrační závislost β -kaseinu

4.4 Analýza reálných vzorků mléka

Byly analyzovány vzorky mléka prodáváného v běžné obchodní síti – mléka trvanlivá ošetřená UHT záhřevem, mléka čerstvá ošetřená pasterizací a mléko sušené. A dále vzorky mléka lyofilizovaného, které nepodstoupilo žádnou tepelnou úpravu z výše uvedených.

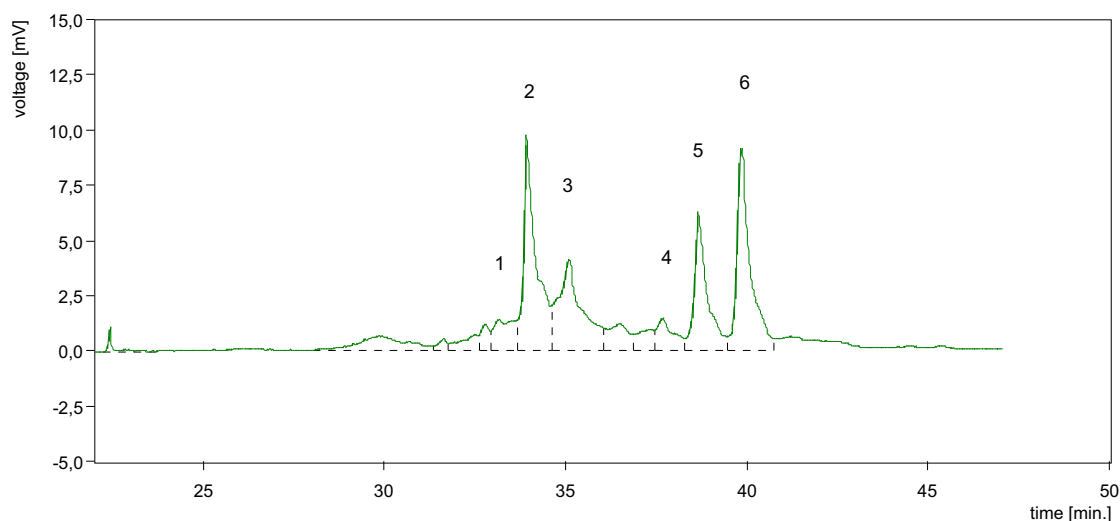
4.4.1 Trvanlivá mléka ošetřená UHT záhřevem

Kasein byl izolován z 5 ml mléka postupem popsáním v kapitole 3.3. Navážka kaseinu byla rozpuštěna v 1 ml zředěného redukčního pufru (kapitola 3.3) a analyzována. Vzorky byly analyzovány dvakrát, z průměru ploch integrovaných v programu CSW bylo dosažením do rovnice kalibrační přímky vypočteno zastoupení α_S - a β -CN v navážce a poté jejich koncentrace v mléce. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách.

Trvanlivé polotučné mléko

Tabulka 8: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v trvanlivém polotučném mléce

Výtěžek kaseinu z 5 ml mléka [g]	0,1194	
Koncentrace celkového kaseinu v mléce [g/l]	23,88	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	6,9	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	33,20 – 35,14	37,73 – 39,91
Plocha píku [mV.s]	476,9528	438,9897
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,72	2,23
Zastoupení v navážce [%]	53,91	32,32
Koncentrace v mléce [g/l]	12,87	7,72

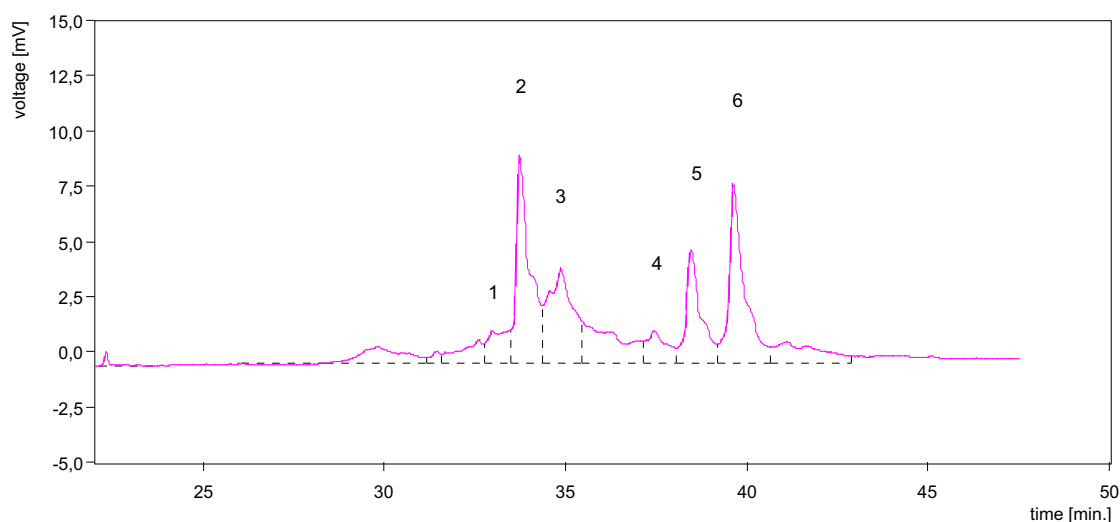


Obr.17: Elektroferogram kaseinů z trvanlivého polotučného mléka. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Trvanlivé odtučněné mléko

Tabulka 9: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v trvanlivém odtučněném mléce

Výtěžek kaseinu z 5 ml mléka [g]	0,1102	
Koncentrace celkového kaseinu v mléce [g/l]	22,04	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	7,1	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	33,03 – 34,92	37,52 – 39,71
Plocha píku [mV.s]	504,5360	451,6108
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,94	2,29
Zastoupení v navážce [%]	55,49	32,25
Koncentrace v mléce [g/l]	12,23	7,11

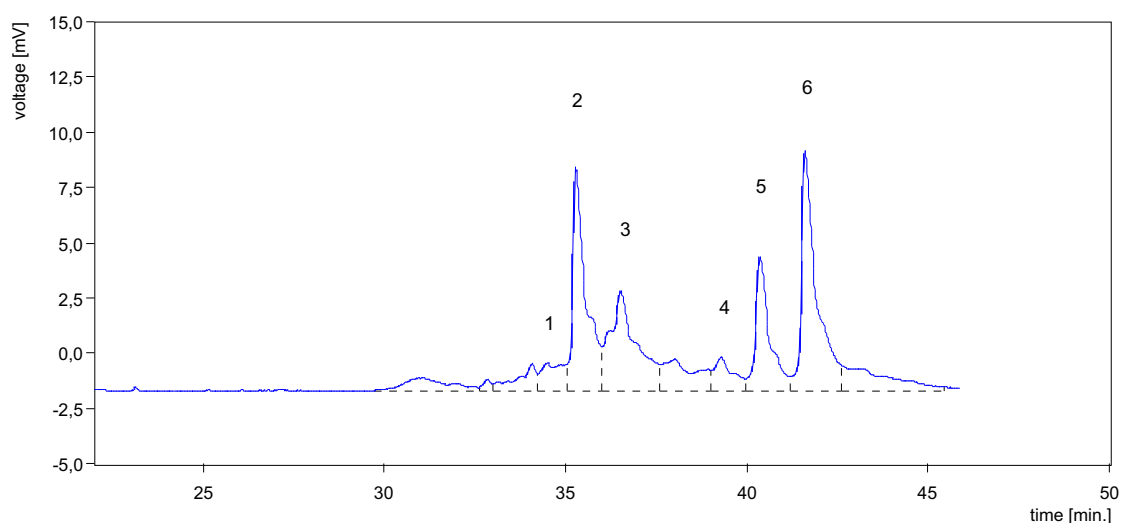


Obr.18: Elektroferogram kaseinů z trvanlivého odtučněného mléka. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Trvanlivé plnotučné mléko

Tabulka 10: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v trvanlivém plnotučném mléce

Výtěžek kaseinu z 5 ml mléka [g]	0,1313	
Koncentrace celkového kaseinu v mléce [g/l]	26,26	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	7,9	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	34,54 – 36,60	39,36 – 41,68
Plocha píku [mV.s]	540,9831	549,2863
Obsah kaseinu v navážce [mg]	4,23	2,81
Zastoupení v navážce [%]	53,54	35,57
Koncentrace v mléce [g/l]	14,06	9,34

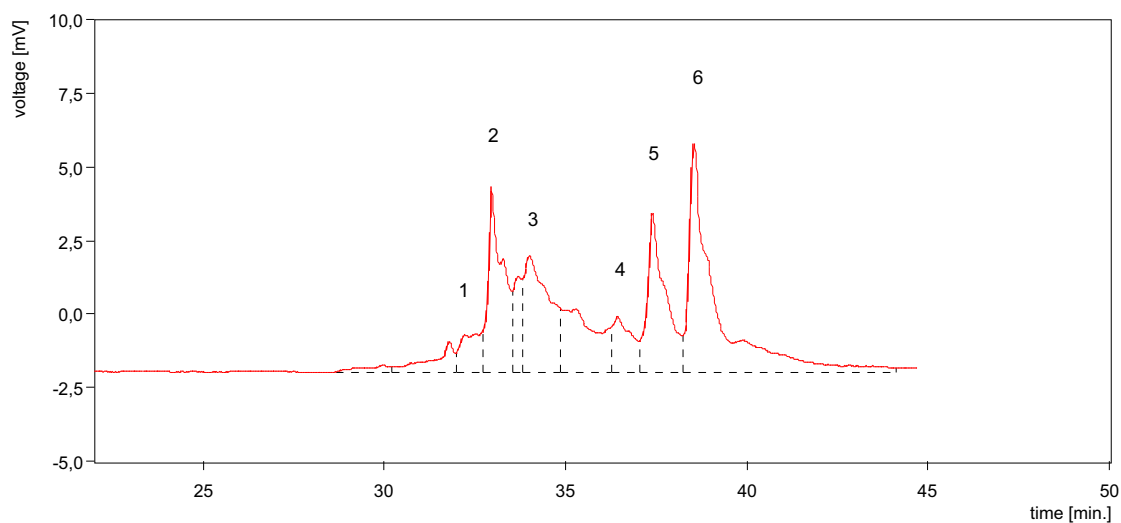


Obr.19: Elektroferogram kaseinů z trvanlivého plnotučného mléka. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Dětské trvanlivé polotučné mléko Lipánek

Tabulka 11: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v dětském mléce Lipánek

Výtěžek kaseinu z 5 ml mléka [g]	0,1210	
Koncentrace celkového kaseinu v mléce [g/l]	24,20	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	6,9	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	32,54 – 34,06	36,50 – 38,60
Plocha píku [mV.s]	472,7870	513,3357
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,68	2,62
Zastoupení v navážce [%]	53,33	37,97
Koncentrace v mléce [g/l]	12,91	9,19



Obr.20: Elektroferogram kaseinů z dětského mléka Lipánek. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Nejvyšší výtěžky celkového kaseinu i jednotlivých kaseinů byly získány z plnotučného mléka. Koncentrace α_S -CN byla největší u odtučněného mléka, u ostatních UHT mlék byly jeho obsahy přibližně stejné. V porovnání s ostatními vzorky mělo mléko Lipánek mnohem vyšší koncentraci β -CN. U všech vzorků došlo k nekvalitnímu rozdělení píků α_S -kaseinu, nejhůře u dětského mléka Lipánek, pravděpodobně nebyly dostatečně redukovány. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12: *Průměrné výtěžky a obsahy kaseinů u jednotlivých UHT mlék*

	Polotučné UHT mléko	Odtučněné UHT mléko	Plnotučné UHT mléko	Dětské UHT mléko Lipánek
Výtěžek celkového kaseinu [g/l]	23,88	22,04	26,26	24,20
Výtěžek α_S -CN [g/l]	12,87	12,23	14,06	12,91
Výtěžek β -CN [g/l]	7,72	7,11	9,34	9,19
Procentuální zastoupení α_S -CN	53,91	55,49	53,54	53,33
Procentuální zastoupení β -CN	32,32	32,25	35,57	37,97

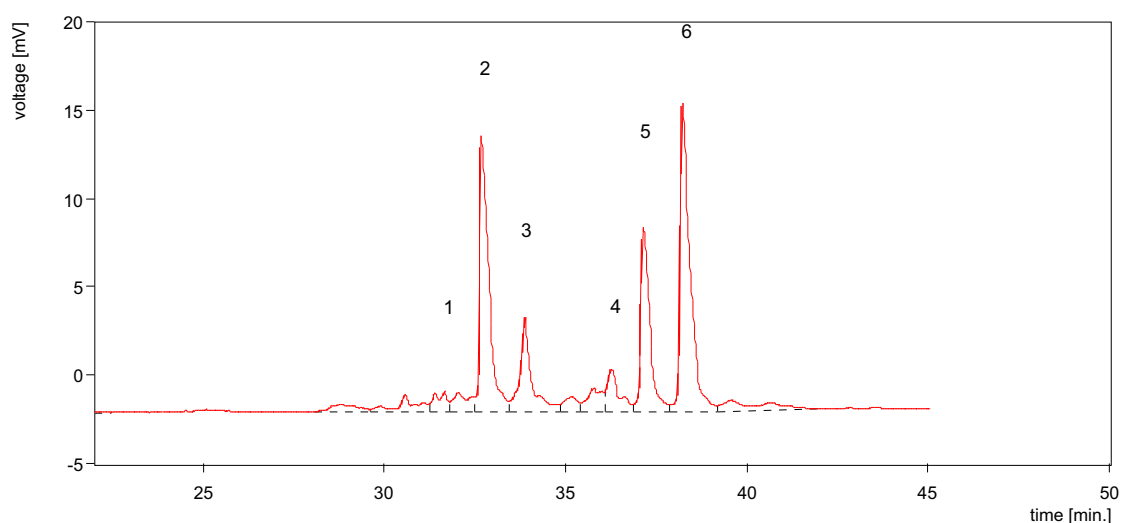
4.4.2 Čerstvá mléka ošetřená pasterizací

Postupem popsaným v kapitole 3.3 byl z 5 ml mléka izolován kasein. Navážka kaseinu byla rozpuštěna v 1 ml zředěného redukčního pufru (kapitola 3.3) a analyzována. Vzorky byly analyzovány dvakrát, z průměru ploch integrovaných v programu CSW bylo dosažením do rovnice kalibrační přímky vypočteno zastoupení α_S - a β -CN v navážce a poté jejich koncentrace v mléce. Výsledky jsou zapsány do tabulek.

Bio mléko

Tabulka 13: *Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v bio mléce*

Výtěžek kaseinu z 5 ml mléka [g]	0,1352		
Koncentrace celkového kaseinu v mléce [g/l]	27,04		
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	7,2		
Složka	α_S -CN	β -CN	
Migrační čas [min]	31,70 – 33,92	36,33 – 38,28	
Plocha píku [mV.s]	464,9918	559,4695	
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,62	2,87	
Zastoupení v navážce [%]	50,28	39,86	
Koncentrace v mléce [g/l]	13,60	10,78	

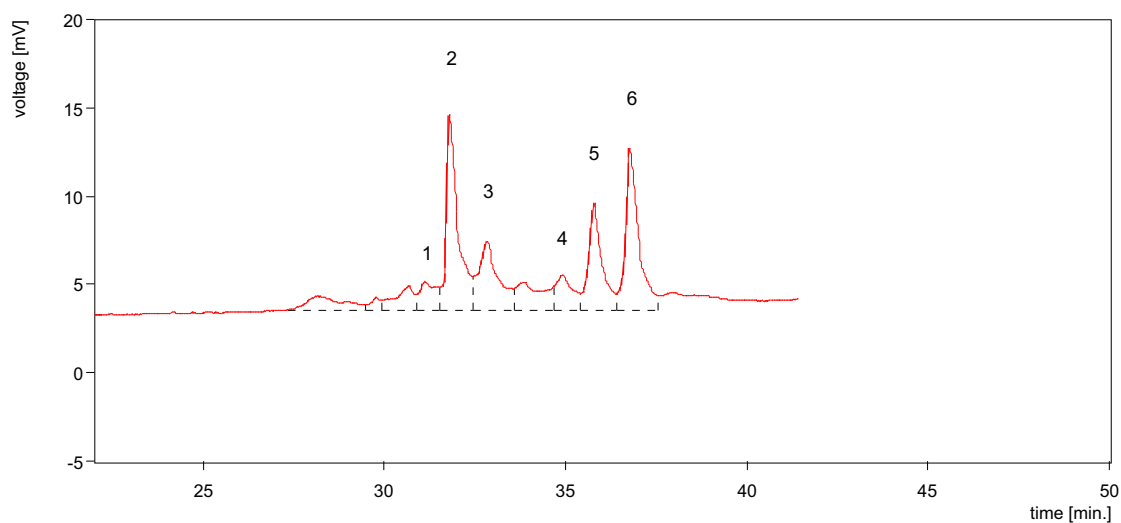


Obr.21: Elektroferogram kaseinů z bio mléka. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Čerstvé polotučné mléko

Tabulka 14: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v čerstvém polotučném mléce

Výtěžek kaseinu z 5 ml mléka [g]	0,1248	
Koncentrace celkového kaseinu v mléce [g/l]	24,96	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	6,3	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	31,17 – 32,87	34,97 – 36,84
Plocha píku [mV.s]	439,1761	455,4780
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,42	2,31
Zastoupení v navážce [%]	54,29	36,67
Koncentrace v mléce [g/l]	13,55	9,15



Obr.22: Elektroferogram kaseinů z čerstvého polotučného mléka. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Z bio mléka bylo získáno více kaseinu než z čerstvého polotučného mléka, zároveň také došlo k výbornému rozdělení píků téměř k základní linii. Polotučné mléko mělo vyšší koncentraci α_S -CN, bio mléko naopak vyšší obsah β -CN. Výsledky jsou pro porovnání uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: *Průměrné výtěžky a obsahy kaseinů v čerstvém mléce*

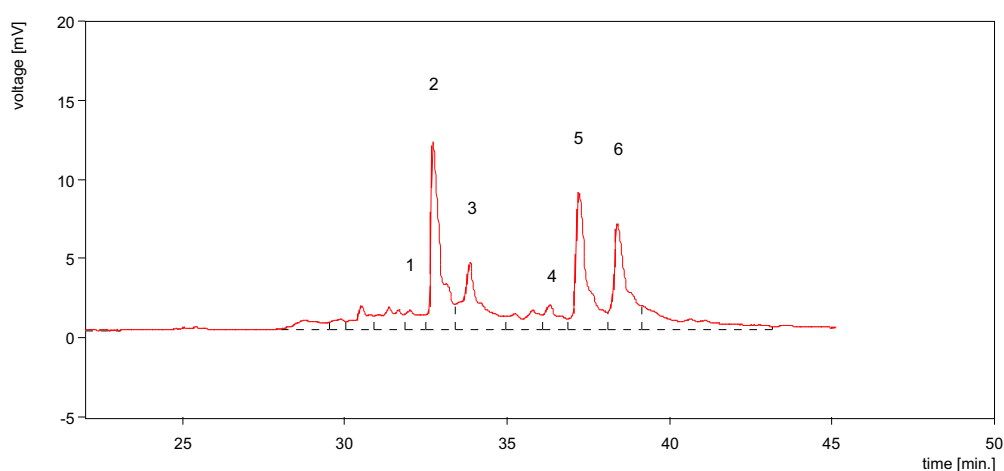
	Bio mléko	Čerstvé polotučné mléko
Výtěžek celkového kaseinu [g/l]	27,04	24,96
Výtěžek α_S -CN [g/l]	13,60	13,55
Výtěžek β -CN [g/l]	10,78	9,15
Procentuální zastoupení α_S -CN	50,28	54,29
Procentuální zastoupení β -CN	39,86	36,67

4.4.3 Sušené polotučné mléko

0,5032 g sušeného mléka bylo rozpuštěno v 5 ml vody. Po půlhodinové inkubaci při laboratorní teplotě byl z mléka vysrážen kasein podle postupu v kapitole 3.3. Navážka kaseinu byla rozpuštěna v 1 ml zředěného redukčního pufru a analyzována. Další postup analýzy byl stejný jako u předchozích vzorků mléka. Tabulka 16 uvádí průměrné výtěžky a koncentrace kaseinů v mléčné sušině.

Tabulka 16: *Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v sušeném polotučném mléce*

Výtěžek kaseinu z 0,5032 g mléka [g]	0,1290	
Koncentrace celkového kaseinu v mléčné sušině [g/kg]	256,36	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	6,7	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	32,06 – 33,90	36,37 – 38,47
Plocha píku [mV.s]	435,8850	472,3900
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,39	2,40
Zastoupení v navážce [%]	50,60	35,82
Koncentrace v mléčné sušině [g/kg]	129,72	91,83

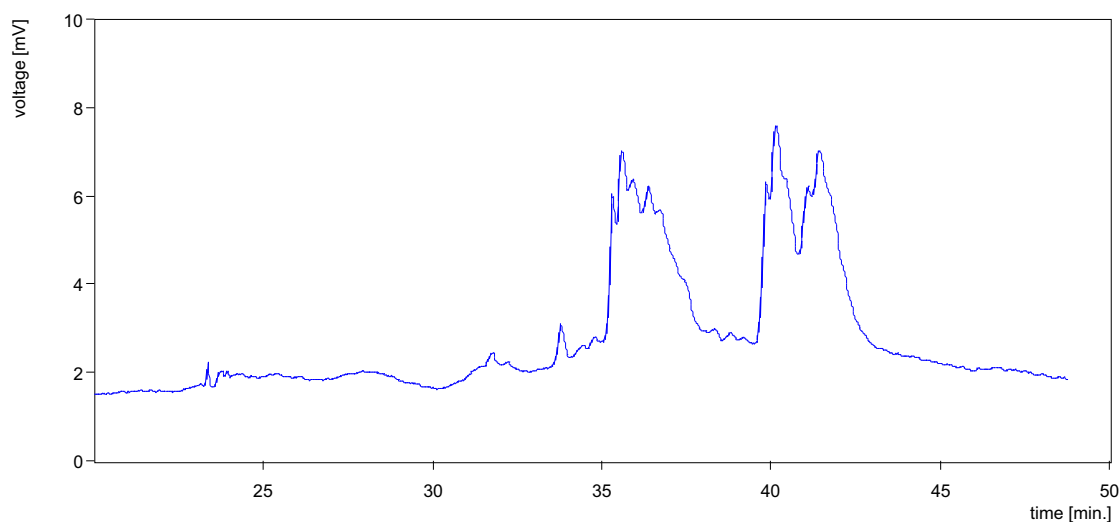


Obr.23: *Elektroferogram kaseinů ze sušeného polotučného mléka. Píky: 1 = α_{S1} -CN; 2 = α_{S2} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²*

Vzhled elektroferogramu kaseinů sušeného mléka nevykazuje žádné větší změny v porovnání s čerstvými nebo UHT mléky. Sušení v proudu horkého vzduchu tedy zřejmě nemá zásadní vliv na izolaci kaseinů a jejich následnou analýzu. Rozdíly jsou jen v zastoupení genetických variant β -CN, varianta β -CN A¹ převažuje nad obsahem varianty A² narozdíl od výše uvedených mlék.

4.4.4 Lyofilizovaná mléka

Při rozpouštění vzorků lyofilizovaného mléka ve vodě se vyskytly problémy. Mléko nešlo uvést do původního stavu, na hladině se tvořily sraženiny (pravděpodobně tuk), které se nepodařilo rozpustit ani při intenzivním míchání nebo vložení do ultrazvuku. Byl zvolen následující postup – vzorky byly nejdříve promíchány se 4 ml vody o teplotě 40 °C a následně vloženy do ultrazvukové lázně vytemperované na 40 – 50 °C a tam ponechány alespoň 30 minut. Tímto způsobem sice nedošlo k úplnému rozpouštění, vytvořila se suspenze, kde byly patrné ještě miniaturní částčky, nicméně za daných podmínek nebylo možno dosáhnout lepších výsledků. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu byl podle postupu z kapitoly 3.3 izolován kasein. Nebylo dosaženo úplných výtěžků a následné analýzy také prokázaly, že tento způsob izolace kaseinů není pro vzorky lyofilizovaného mléka vhodný. U většiny analýz nedošlo ke kvalitnímu rozdělení píků a obsah kaseinů nemohl být kvantitativně vyhodnocen (obr.24). Příčinou těchto nedostatků byl zřejmě fakt, že mléko nebylo před lyofilizací odtučněno a navíc mohlo při lyofilizaci nějakým způsobem dojít k denaturaci syrovátkových proteinů, které se pak z části vázaly na kaseiny a působily problémy při redukci kaseinových micel. Tyto domněnky potvrdil také ing. Vladimír Černý ze společnosti Milcom, a.s., Tábor.



Obr.24: Elektroferogram kaseinů izolovaných z lyofilizovaného mléka, nevydařená analýza

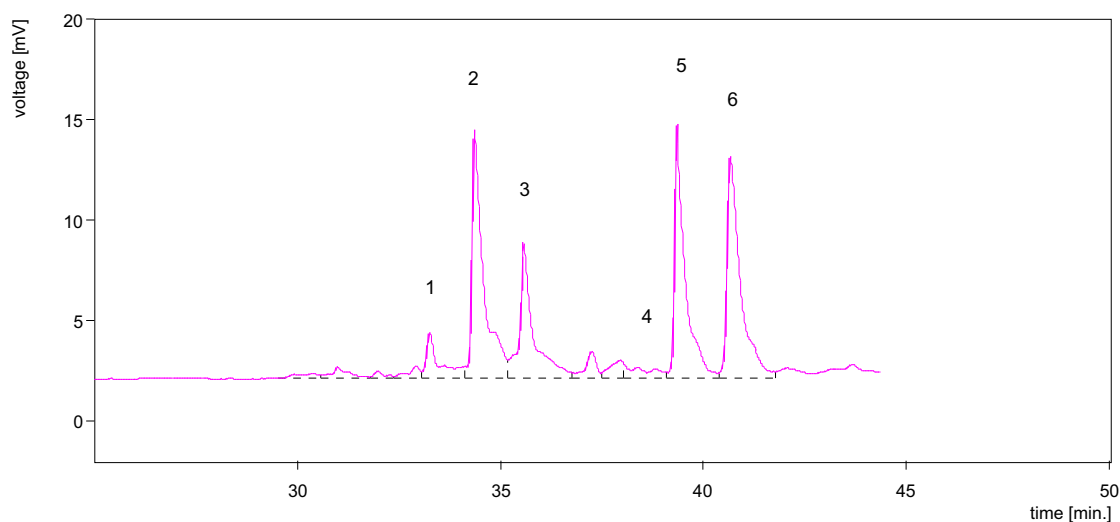
Navzdory uvedeným problémům se podařilo některé vzorky lyofilizovaného mléka redukovat a jejich analýzou byly získány kvalitní elektroferogramy. I přesto, že výtěžky z těchto vzorků nebyly kvantitativní, mohly být alespoň porovnány profily kaseinových frakcí jednotlivých dojnic.

Kontrolní skupina dojnic krmená doplňkovou směsí na bázi řepkových pokrutin

Dojnice č. 1

Tabulka 17: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v lyofilizovaném mléce – dojnice č.1

Výtěžek kaseinu z 0,4002 g mléka [g]	0,0920	
Koncentrace kaseinu v mléčné sušině [g/kg]	229,89	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	7,0	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	33,29 – 35,63	38,11 – 40,72
Plocha píku [mV.s]	462,4128	533,7546
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,60	2,73
Zastoupení v navážce [%]	51,43	39,00
Koncentrace v mléčné sušině [g/kg]	118,23	89,66

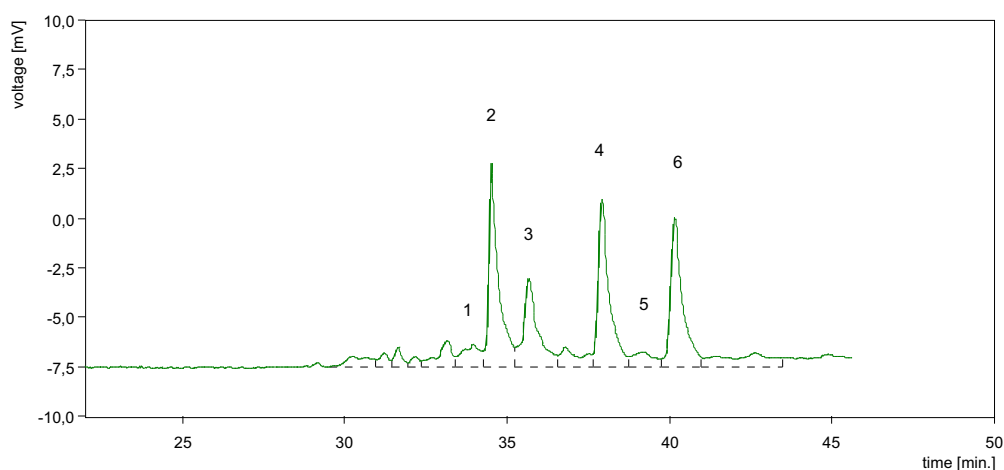


Obr.25: Elektroferogram kaseinů z lyofilizovaného mléka – dojnice č.1. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Dojnice č. 2

Tabulka 18: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v lyofilizovaném mléce – dojnice č.2

Výtěžek kaseinu z 0,3998 g mléka [g]	0,0781	
Koncentrace kaseinu v mléčné sušině [g/kg]	195,35	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	5,9	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	34,01 – 35,72	37,97 – 40,23
Plocha píku [mV.s]	396,503	429,7378
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,08	2,18
Zastoupení v navážce [%]	52,20	36,95
Koncentrace v mléčné sušině [g/kg]	101,97	72,18



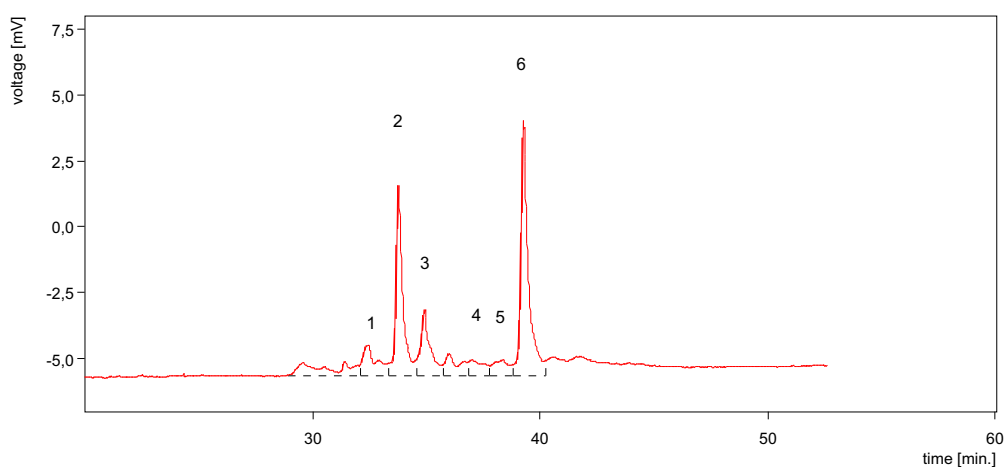
Obr.26: Elektroferogram kaseinů z lyofilizovaného mléka – dojnice č.2. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Pokusná skupina dojnic krmená doplňkovou směsí na bázi extrudované sóji

Dojnice č. 3

Tabulka 19: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v lyofilizovaném mléce – dojnice č.3

Výtěžek kaseinu z 0,4041 g mléka [g]	0,1109	
Koncentrace kaseinu v mléčné sušině [g/kg]	274,44	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	3,8	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	32,51 – 34,98	37,06 – 39,35
Plocha píku [mV.s]	269,3782	295,0507
Obsah kaseinu v navážce [mg]	2,06	1,46
Zastoupení v navážce [%]	54,21	38,42
Koncentrace v mléčné sušině [g/kg]	148,77	105,44

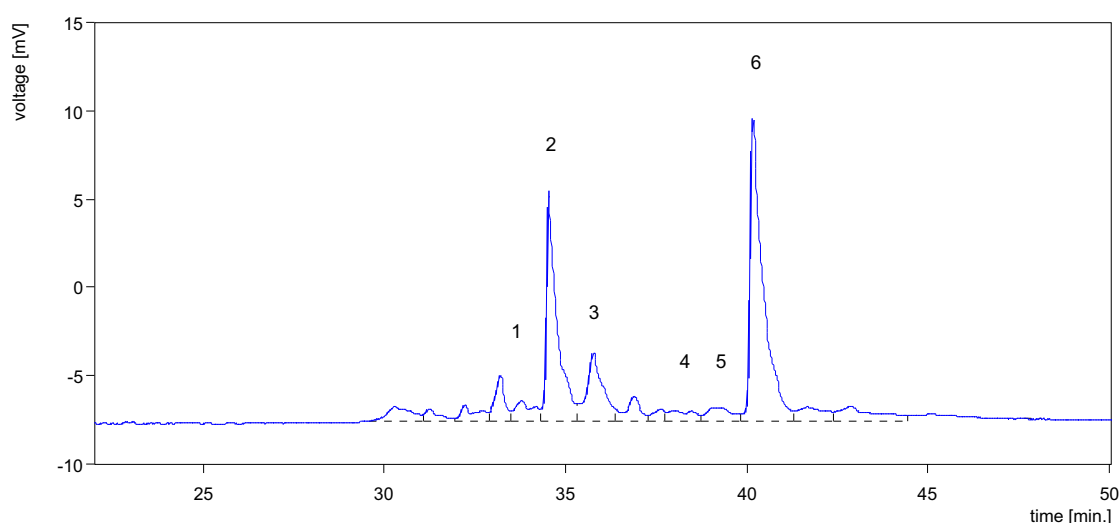


Obr.27: Elektroferogram kaseinů z lyofilizovaného mléka – dojnice č.3. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

Dojnice č. 4

Tabulka 20: Přehled výtěžků a koncentrací α_S - a β -CN v lyofilizovaném mléce – dojnice č.4

Výtěžek kaseinu z 0,4008 g mléka [g]	0,1012	
Koncentrace kaseinu v mléčné sušině [g/kg]	252,50	
Navážka izolovaného kaseinu [mg]	6,9	
Složka	α_S -CN	β -CN
Migrační čas [min]	33,24 – 35,81	38,03 – 40,23
Plocha píku [mV.s]	488,2465	505,8334
Obsah kaseinu v navážce [mg]	3,81	2,58
Zastoupení v navážce [%]	55,22	37,39
Koncentrace v mléčné sušině [g/kg]	139,43	94,41



Obr.28: Elektroferogram kaseinů z lyofilizovaného mléka – dojnice č.4. Píky: 1 = α_{S2} -CN; 2 = α_{S1} -CN; 3 = α_{S0} -CN; 4 = β -CN B; 5 = β -CN A¹; 6 = β -CN A²

V tabulce 21 jsou shrnuty průměrné výtěžky a zastoupení kaseinů u obou skupin. Výtěžek celkového kaseinu i jednotlivých kaseinů byl vyšší u pokusné skupiny. Ve srovnání s kontrolní skupinou dojníc také vzrostla koncentrace α_S -CN. Obsah β -CN nebyl ovlivněn a zůstal ve skupinách téměř stejný.

U jednotlivých krav lze navíc pozorovat rozdíly v zastoupení genetických variant β -CN. Zatímco dojnice č.1 měla podobný profil jako vykazovala mléka z obchodu, tzn. hlavní zastoupení A¹ a A² varianty β -CN, ostatní dojnice měly složení jiné. Dojnice č.2 měla v mléce zastoupení variantu β -CN A² a větší množství β -CN B. U dojníc č.3 a 4 je pak z elektroferogramu patrný převažující vliv jediné genetické varianty – β -CN A².

Tabulka 21: Průměrné výtěžky a obsahy kaseinů v jednotlivých skupinách

	Kontrolní skupina	Pokusná skupina
Výtěžek celkového kaseinu [g/kg]	212,62	263,47
Výtěžek α_S -CN [g/kg]	110,1	144,1
Výtěžek β -CN [g/kg]	80,92	99,93
Procentuální zastoupení α_S -CN	51,82	54,72
Procentuální zastoupení β -CN	37,98	37,91

4.5 Validační parametry

Linearita

Na kalibračních přímkách standardů byla ověřena linearita odezvy detektoru. Kalibrační závislosti pro 3 různé koncentrace směsného standardu jsou ve svém rozsahu téměř lineární. (obr. 15,16). Je to potvrzeno i hodnotou korelačního koeficientu, jehož hodnota je u α S-CN $R^2 = 0,9988$ a u β -CN $R^2 = 0,9983$.

Opakovatelnost

Opakovatelnost migračních časů a ploch píků při použití nepokryté kapiláry byla zhodnocena z 6 po sobě jdoucích nástřiků kaseinu izolovaného z bio mléka. Analýzy byly provedeny ve stejném pufru (bez výměny). Tabulka 22 shrnuje vypočtené aritmetické průměry, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky pro některé z kaseinů. Směrodatné odchylky byly z daných dat vygenerovány v programu Excel. Relativní směrodatné odchylky byly vypočítány podle vzorce (1) uvedeného v kapitole 3.4.

Tabulka 22: Opakovatelnost migračních časů a ploch píků kaseinů z bio mléka, analýzy v 10 mM fosfátovém pufru, pH 2,5, při 30 kV

Nástřik	Migrační čas [min]			
	α S ₁ -CN	α S ₀ -CN	β -CN A ¹	β -CN A ²
1	33,63	34,81	38,16	39,27
2	33,71	34,91	38,29	39,41
3	33,70	34,88	38,28	39,4
4	33,92	35,05	38,27	39,3
5	33,66	34,83	38,12	39,12
6	33,23	34,42	37,72	38,78
x	33,64	34,82	38,14	39,21
SMODCH	0,23	0,21	0,22	0,24
RSD [%]	0,67	0,61	0,57	0,60
Nástřik	Plocha píku [mV.s]			
	α S ₁ -CN	α S ₀ -CN	β -CN A ¹	β -CN A ²
1	193,6526	99,4550	137,8143	271,5254
2	195,5776	101,0892	141,0804	278,7318
3	190,5892	97,4119	133,7345	264,7458
4	185,4672	94,8771	129,0447	254,7762
5	192,2159	97,5723	135,7291	272,1248
6	197,8496	105,7005	138,6676	280,7337
x	192,5587	99,3510	136,0118	270,4396
SMODCH	4,3033	3,7493	4,2379	9,5552
RSD [%]	2,23	3,77	3,12	3,53

x = aritmetický průměr; SMODCH = směrodatná odchylka; RSD = relativní směrodatná odchylka

U migračních časů byla pozorována velmi dobrá reprodukovatelnost s RSD menší než 0,67 %. Méně uspokojivá byla opakovatelnost ploch píků s RSD v rozmezí 2,23 – 3,77 %. Podle výsledků lze usoudit, že daná technika je reprodukovatelná.

5 ZÁVĚR

Literární část této práce pojednává o mléčných kaseinech, uvádí jejich klasifikaci, strukturu a způsob výroby. Dále také udává jejich základní chemické i fyzikální vlastnosti, které mají velký význam pro využití kaseinů a jejich produktů jako aditiv v mnoha potravinářských i technických aplikacích. Následující část popisuje faktory, kterými lze ovlivnit složení mléka. Jsou popsány některé nenutriční vlivy, ale hlavně vliv výživy dojníc na skladbu mléka. Důraz je kladen především na změnu ve složení mléčných proteinů. V závěru literární rešerše je sestaven přehled metod kapilární elektroforézy užívaných pro stanovení kaseinových frakcí.

Cílem diplomové práce bylo vypracovat metodu pro stanovení kaseinů v kravském mléce za použití kapilární zónové elektroforézy jako finální analytické koncovky.

CZE probíhala na přístroji PrinCE 460 Autosampler ve spojení s UV detektorem. Pro analýzy byla používána křemenná kapilára s neupraveným vnitřním povrchem o celkové délce 96 cm, efektivní délce 71 cm a vnitřním průměru 50 μm . Základní elektrolyt byl vybrán na základě literární rešerše podle metody De Jonga et al. [64]. Byl použit 10 mM fosfátový pufr s obsahem 8 M močoviny a polymerního aditiva HPMC (0,05 %), hodnota pH byla nastavena na 2,5.

Byl proveden výběr redukčního pufru, volba separačního napětí a doby nástřiku vzorku. Ze tří testovaných redukčních pufrů byl zvolen roztok se složením 0,25 M Tris, 10 mM DTT a 8 M močovina o pH 8,8, který prokázal nejlepší rozrušení kaseinových micel a tím přispěl i k nejvyššímu rozdělení píků. Dále bylo vybráno separační napětí 30 kV a nástřik vzorků tlakem 5 kPa po dobu 18 s. Obě tyto podmínky dovozovaly celkem dobré oddělení píků hlavních kaseinových frakcí. Migrace probíhala při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ a pro detekci kaseinů byla použita vlnová délka 214 nm, tento údaj byl zjištěn v dostupné literatuře.

Pro zvýšení reprodukovatelnosti stanovení byla kapilára mezi jednotlivými analýzami promývána. Nejlepší opakovatelnost byla dosažena při následující sekvenci promývání: 1 minutu vodou, 3 minuty hydroxidem sodným, 1 minutu vodou a 5 minut základním elektrolytem. Na konci každého dne pak byla kapilára promývána vodou po dobu 15 minut.

Optimalizovaný systém byl nejdříve testován na standardních roztocích kaseinů. Podařilo se separovat hlavní kaseinové frakce kravského mléka – α_{S} - a β -kasein a navíc u α_{S} -kaseinu i některé fosforylované stavy a u β -kaseinu několik genetických variant. κ -kasein nebyl ve vzorku identifikován. Patrně došlo k jeho překrytí s ostatními píky a nepodařilo se ho oddělit ani úpravou separačních podmínek, což představuje výzvu pro další zkoumání použité metody a odstranění tohoto nedostatku.

Z analýz roztoků směsných standardů byly sestaveny kalibrační závislosti, z nichž byly následně počítány koncentrace a procentuální zastoupení hlavních kaseinů v mléce. Na základě korelačních koeficientů kalibračních přímků byla také potvrzena linearita použité metody.

Pro analýzy reálných vzorků mléka byla nutná předběžná úprava matrice, která zahrnovala izolaci kaseinů a jejich redukci ve vzorkovacím pufru. Kaseiny byly z mléka vysráženy 10% kyselinou octovou. Ta byla přidávána za stálého míchání až do dosažení pH 4,6, kdy došlo k precipitaci kaseinů. Sraženina kaseinů byla odfiltrována na fritě za sníženého tlaku, tuky byly odstraněny opakovaným promýváním acetonem a kasein byl poté vysušen. Tento způsob izolace nedělal u vzorků koupeného mléka problémy. Ty nastaly až při pokusu izolovat kasein ze vzorků mléka lyofilizovaného. Toto mléko nešlo zpět zcela rozpustit a to ani v teplé vodě

a ponořením do ultrazvuku. Důvodem toho byl zřejmě tuk v mléce obsažený, který spolu s bílkovinami tvořil sraženiny. Nutno říct, že u sušeného mléka, kde byl obsah tuku standardizován, k těmto potížím nedošlo. Pro úspěšnou izolaci mléčných bílkovin by bylo tedy vhodné lyofilizovat už odstředěné mléko.

Získaný kasein byl rozpuštěn v redukčním pufru a po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě analyzován. Identifikace kaseinů byla provedena na základě srovnání se standardy a literaturou. Většina vzorků byla redukována dostatečně a jednotlivé píky byly dobře rozlišeny. Nedostatky se projevíly opět u lyofilizovaného mléka, kde ani po dlouhodobé inkubaci ve vzorkovacím pufru nedošlo ke kvalitní separaci. Příčinou může být také špatné oddělení syrovátkových bílkovin, které svou adsorpcí na kaseiny znemožňují jejich úplnou redukci.

Bylo analyzováno několik skupin mléka. První skupinu představovala mléka ošetřená UHT záhřevem. Výťažky celkového kaseinu se pohybovaly mezi 22,04 g/l pro odtučněné mléko a 26,26 g/l pro plnotučné mléko. Všechna mléka měla velmi podobný elektroferogram s hůře rozdělenými píky α_S -kaseinu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 23.

Tabulka 23: *Průměrné výťažky a obsahy kaseinů u jednotlivých UHT mlék*

	Polotučné UHT mléko	Odtučněné UHT mléko	Plnotučné UHT mléko	Dětské UHT mléko Lipánek
Výtěžek kaseinu [g/l]	23,88	22,04	26,26	24,20
Výtěžek α_S -CN [g/l]	12,87	12,23	14,06	12,91
Výtěžek β -CN [g/l]	7,72	7,11	9,34	9,19
% α_S -CN	53,91	55,49	53,54	53,33
% β -CN	32,32	32,25	35,57	37,97

Další skupinou byla čerstvá mléka ošetřená pasterizací. V porovnání s UHT mlékami došlo k lepší separaci píků, což je patrné zejména v elektroferogramu bio mléka. Výsledky analýz uvádí tabulka 24.

Tabulka 24: *Průměrné výťažky a obsahy kaseinů v čerstvém pasterizovaném mléce*

	Bio mléko	Čerstvé polotučné mléko
Výtěžek celkového kaseinu [g/l]	27,04	24,96
Výtěžek α_S -CN [g/l]	13,60	13,55
Výtěžek β -CN [g/l]	10,78	9,15
% α_S -CN	50,28	54,29
% β -CN	39,86	36,67

Byla provedena i analýza sušeného mléka, které bylo vyrobeno z pasterizovaného mléka sušeného v proudě horkého vzduchu. Výtěžek kaseinu činil 256,36 g/kg mléčné sušiny, s 50,6% zastoupením α_S -kaseinu a 35,82% podílem β -kaseinu. Profil jednotlivých kaseinů v elektroferogramu byl podobný jako u předchozích vzorků mléka, takže tepelná úprava nezpůsobila žádné znatelné změny. Rozdíl byl pouze v zastoupení genetických variant β -kaseinu s převahou varianty A¹ nad A².

Poslední skupinu tvořila lyofilizovaná mléka. Vzorky pocházely od čtyř dojnic rozdělených do dvou skupin, u kterých byl sledován vliv výživy na obsah kaseinů. Pokusná skupina přijímala doplňkové krmivo na bázi extrudované sóji, kontrolní skupina krmivo

na bázi řepkových pokrutin. U většiny těchto vzorků se nepodařilo kaseiny redukovat, proto nedošlo k dobré separaci jednotlivých píků. I přes zmíněné problémy byly některé analýzy použitelné. Výtěžky a koncentrace kaseinů jsou zapsány v tabulce 25. Pokusná skupina měla jak vyšší výtěžek celkového kaseinu, tak i koncentraci α_S -kaseinu, obsah β -kaseinu zůstal ve skupinách téměř nezměněn. Na získaných elektroferogramech (obr.25,26,27,28) lze dobře pozorovat rozdílné zastoupení genetických variant β -kaseinu u jednotlivých dojnic.

Tabulka 25: *Průměrné výtěžky a obsahy kaseinů v jednotlivých skupinách dojnic*

	Kontrolní skupina	Pokusná skupina
Výtěžek celkového kaseinu [g/kg]	212,62	263,47
Výtěžek α_S -CN [g/kg]	110,1	144,1
Výtěžek β -CN [g/kg]	80,92	99,93
% α_S -CN	51,82	54,72
% β -CN	37,98	37,91

Elektroforetické podmínky prezentované v této práci lze dobře využít pro stanovení dvou hlavních kaseinů kravského mléka – α_S - a β -kaseinu, několika fosforylovaných stavů α_S -kaseinu a 3 genetických variant β -kaseinu. Analýza trvala maximálně 45 minut. Izolace kaseinů uvedeným způsobem byla použitelná pro všechny analyzované vzorky mléka s výjimkou mléka lyofilizovaného, kde zřejmě působil potíže nestandardizovaný obsah tuku. Vypočtené hodnoty relativních směrodatných odchylek migračních časů nižší než 0,67 % a ploch píků v rozmezí 2,23 – 3,77 % potvrdily, že daná technika je reprodukovatelná.

V budoucnu by mohla tato práce pokračovat optimalizací postupu pro stanovení κ -kaseinu a také vylepšením způsobu izolace kaseinů ze vzorků lyofilizovaného mléka.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Zdražil, K.: Mlékařství. 1.vyd. Praha: ISV Nakladatelství, 2002. 127s. ISBN 80-86642-15-1
- [2] deMan, J.M.: Principles of Food Chemistry. 3rd ed. Springer Verlag, 1999, 520 p. ISBN 0-8342-1234-3
- [3] Yada, R.Y.: Proteins in Food Processing. 1st ed. Woodhead Publishing, 2004, 728 p. ISBN 978-1-85573-723-5
- [4] Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. 1st ed. London, New York: Blackie Academic & Professional, 1998, 496 p. ISBN 0-412-72000-0
- [5] Creamer, L. K., MacGibbon, A. K. H.: Some Recent Advances in the Basic Chemistry of Milk Proteins and Lipids, *International Dairy Journal*, 1996, 6, pp. 539-568
- [6] Velíšek, J.: Chemie potravin 1. 2.vyd. Tábor: OSSIS, 2000. 328s. ISBN 80-86659-00-3
- [7] Smit, G.: Dairy Processing – Improving Quality. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. 546p. ISBN 1-85573-676-4
- [8] Walstra, P., Jennes, R.: Dairy Chemistry and Physics. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 1984, 467 p. ISBN 0-471-09779-9
- [9] Walstra, P.: Casein sub-micelles: do they exist?, *International Dairy Journal*, 1999, 9, pp. 189-192
- [10] Holt, C.: Structure and properties of bovine casein micelles, *Advanced Protein Chemistry*, 1992, 43, pp. 63-151
- [11] Horne, D.S.: Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products, *International Dairy Journal*, 1998, 8, pp. 171-177
- [12] Forman, L.: Mlékárenská technologie II. 2.vyd. Praha: VŠCHT, 1996. 228s. ISBN 80-7080-250-2
- [13] Drdák, M., Studnický, J., Mórová, E., Karovičová, J.: Základy potravinářských technologií. 1.vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. 512s. ISBN 80-967064-1-1
- [14] Hui, Y.H.: Dairy Science and Technology Handbook, Volumes 1-3, USA: Willey-VCH, Inc., 1993, 1304 p. ISBN 1-56081-078-5
- [15] Audic, J.-L., Chaufer, B., Daufin, G.: Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review, *Le Lait*, 2003, 83, pp. 417-438
- [16] *Casein - Clarion Casein Private Limited* [online]. Clarion Casein Private Limited, c2001-2005, poslední revize 23.5.2005 [cit. 2007-12-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.clarioncasein.com/casein.htm>>
- [17] Rouette, H.-K.: Encyclopedia of Textile Finishing, 1st ed. Woodhead Publishing, 2001. 3011 p. ISBN 978-3-540-65031-7
- [18] Brydson, J.A.: Plastics materials. 7th ed. Elsevier, 1999, 920p., ISBN 0-7506-4132-0
- [19] Vaz, C. M., Fossen, M., van Tuil, R. F., de Graaf, L. A., Reis, R. L., Cunha, A. M.: Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 65, pp. 60 – 70

- [20] Khwalidia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., Hardy, J.: Milk Proteins for Edible Films and Coatings, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, vol. 44, no. 4, pp. 239-251
- [21] Kennelly, J.J., Bell, J.A., Keating, A.F., Doepel, L.: Nutrition as a Tool to Alter Milk Composition, *Advances in Dairy Technology*, 2005, 17, pp. 255-275
- [22] Sutton, J.D.: Altering milk composition by feeding, *Journal of Dairy Science*, 1989, 72, pp. 2801-2814
- [23] Bačina, J. a kol.: Živočišná výroba I – Chov veľkých hospodárskych zvierat, 1.vyd. Bratislava: Príroda, 1976. 425 s.
- [24] Varga, G.A., Ishler, V.A.: Managing nutrition for optimal milk components in proceedings from Western Dairy Management Conference, 2007, Reno, Nevada, March 7-9, 2007 [online]. Dostupné na www: <http://www.wdmc.org>
- [25] Chase, L.E.: Dairy feeding programs and milk composition, *Total Dairy Nutrition*, 2000, Vol. 2, No. 2. Dostupné na www: <http://www.ansci.cornell.edu/dm>
- [26] Mudřík, Z., Hučko, B.: Vliv výživy a krmení dojníc na kvalitu mléka. In Sborník referátů z konference „Den mléka 2001“, 26.4.2001. Ed. Alena Ježková. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2001, 83 s. Dostupné na: <http://www.agris.cz>
- [27] Jenkins, T.C., McGuire, M.A.: Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition, *Journal of Dairy Science*, 2006, 89, pp. 1302-1310
- [28] DePeters, E.J., Cant, J.P.: Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review, *Journal of Dairy Science*, 1992, 75, pp. 2043-2070
- [29] Emery, R.S.: Feeding for increased milk protein, *Journal of Dairy Science*, 1978, 61, pp. 825-828
- [30] Raab, L., Vorschneiderová, L.: Přesné zásobení dojníc bílkovinami, Úspěch ve stáji, 1996, č.2
- [31] Raab, L.: Kolik bílkovin potřebuje dojnice?, Úspěch ve stáji, 2004, č.3
- [32] Stádník, L., Louda, F., Toušová, R., Scheinherrová, K.: Vliv výživy dojníc na obsah bílkovin v mléce. In Sborník referátů z konference "Den mléka 2000", 18.5.2000. Ed. Oldřich Obermaier et al. Praha : Česká zemědělská univerzita, 2000, s.55-59. Dostupné na: <http://www.agris.cz>
- [33] Clark, J.H.: Lactational Responses to Postruminal Administration of Proteins and Amino Acids, *Journal of Dairy Science*, 1975, 58, pp. 1178-1197
- [34] Murphy, J.J., O'Mara, F.: Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact on the dairy industry, *Livestock Production Science*, 1993, 35, pp. 117-134
- [35] Schingoethe, D.J.: Dietary influence on protein level in milk and milk yield in dairy cows, *Animal Feed Science and Technology*, 1996, 60, pp. 181-190
- [36] Schwab, C.G., Satter, L.D., Clay, A.B.: Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids, *Journal of Dairy Science*, 1976, Vol. 59, No. 7, pp. 1254-1570
- [37] Kung Jr., L., Rode, L.M.: Amino acid metabolism in ruminants, *Animal Feed Science and Technology*, 1996, 59, pp. 167-172
- [38] Rogers, J.A., Krishnamoorthy, U., Sniffen, C.J.: Plasma Amino Acids and Milk Protein Production by Cows Fed Rumen-Protected Methionine and Lysine, *Journal of Dairy Science*, 1987, 70, pp. 789-798

- [39] Rogers, J.A. et al.: Production responses of dairy cows fed various amounts of rumen-protected methionine and lysine, *Journal of Dairy Science*, 1989, 72, pp. 1800-1817
- [40] Armentano, L.E., Swain, S.M.: Lactational response to ruminally protected methionine and lysine at two amounts of ruminally available nitrogen, *Journal of Dairy Science*, 1993, 76, pp. 2963-2969
- [41] Lukášová, J. a kol.: Hygiena a technologie produkce mléka. 1.vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1999. 101 s. ISBN 80-85114-53-4
- [42] Macleod, G.K., Grieve, D.G., McMillan, I.: Performance of first lactation dairy cows fed complete rations of several ratios of forage to concentrate, *Journal of Dairy Science*, 1983, 66, pp. 1668-1674
- [43] Kim, Y.K., Schingoethe, D.J., Casper, D.P., Ludens, F.C.: Lactational response of dairy cows to increased dietary crude protein with added fat, *Journal of Dairy Science*, 1991, 74, pp. 3891-3899
- [44] Coulon, J.B., Pradel, P., Verdier, I.: Effect of forage type on milk yield, chemical composition and clotting properties of milk, *Le Lait*, 1995, 75, pp. 513-521
- [45] Mackle, T.R., Bryant, A.M., Petch, S.F., Hooper, R.J., Auldist, M.J.: Variation in the composition of milk protein from pasture-fed dairy cows in late lactation and the effect of grain and silage supplementation, *New Zealand Journal of Agriculture Research*, 1999, 42, pp. 147-154
- [46] Fredeen, A.H.: Considerations in the nutritional modification of milk composition, *Animal Feed Science and Technology*, 1996, 59, pp. 185-197
- [47] Jenkins, T.C.: Lipid metabolism in the rumen, *Journal of Dairy Science*, 1993, 76, pp. 3851-3863
- [48] Grummer, R.R.: Effect of feed on the composition of milk fat, *Journal of Dairy Science*, 1991, 74, pp. 3244-3257
- [49] Palmquist, D.L., Beaulieu, D., Barbano, D.M.: Feed and animal factors influencing milk fat composition, *Journal of Dairy Science*, 1993, 76, pp. 1753-1771
- [50] Reklewska, B. et al.: Alternative for modifying the fatty acid composition and decreasing the cholesterol level in the milk of cows, *Livestock Production Science*, 2002, Vol. 76, Issue 3, pp. 235-243
- [51] Hurtaud, C., Lemosquet, S., Rulquin, H.: Effect of graded duodenal infusions of glucose on yield and composition of milk from dairy cows. 2. Diets based on grass silage, *Journal of Dairy Science*, 2000, 83, pp. 2952-2962
- [52] Macleod, G.K., Yu, Y., Schaeffer, L.R.: Feeding value of protected animal tallow for high yielding dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 1977, 60, pp. 726-738
- [53] DePeters, E.J., Taylor, S.J., Finley, C.M., Famula, T.R.: Dietary fat and nitrogen composition of milk from lactating cows, *Journal of Dairy Science*, 1987, 70, pp. 1192-1201
- [54] Prokop, V.: Česká sója – jedna z cest našeho krmivářství. VVS Info [online]. 2004 [cit. 2007-12-11]. Dostupné na www: http://www.vvs.cz/vvs_info/vvs_info.php
- [55] Grummer, R.R., Luck, M.L.: Lactational Performance of Dairy Cows Fed Raw Soybeans, with or Without Animal By-product Proteins, or Roasted Soybeans, *Journal of Dairy Science*, 1994, 77, pp. 1354-1359

- [56] Zhengkang, H., Wang, G., Yao, W., Zhu, W.Y.: Isoflavonic Phytoestrogens – New prebiotics for Farm Animals: a Review on Research in China, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2006, 7, pp. 53-60
- [57] Vrzáňová, M., Heresová, J.: Fytoestrogeny, *Interní medicína pro praxi*, 2003, 9, pp. 448-451
- [58] Lapčík, O., Stárka, L.: Rostlinné estrogeny a menopauza, *Vesmír*, 2004, 83, pp. 531-533
- [59] Messina, M.J.: Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, Vol. 70, No. 3, pp. 439-450
- [60] Tham, D.M., Gardner, Ch.D., Haskell, W.L.: Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998, Vol. 83, No. 7, pp. 2223-2235
- [61] Hester, R.E.; Harrison, R.M.: *Endocrine Disrupting Chemicals*. 1st ed. Royal Society of Chemistry, 1999, 166 p. ISBN 978-0-85404-255-5
- [62] Adams, N.R.: Detection of the Effects of Phytoestrogens on Sheep and Cattle, *Journal of Animal Science*, 1995, 73, pp. 1509-1515
- [63] Chen, F.A., Tusak, A.: Characterization of food proteins by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1994, 685, pp. 331-337
- [64] De Jong, N., Visser, S., Olieman, C.: Determination of milk proteins by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1993, 652, pp. 207-213
- [65] Vallejo-Cordoba, B.: Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by capillary electrophoresis, *Journal of Capillary Electrophoresis*, 1997, 4, pp. 219-224
- [66] Fairise, J.-F., Cayot, P.: New ultrarapid method for the separation of milk proteins by capillary electrophoresis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, pp. 2628-2633
- [67] Otte, J., Zakora, M., Kristiansen, K.R., Qvist, K.B.: Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis, *Le Lait*, 1997, 77, pp. 241-257
- [68] Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M.A., Amigo, L., Krause, I., Ramos, M.: Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para- κ -casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2001, 915, pp. 225-230
- [69] Strickland, M., Johnson, M.E., Broadbent, J.R.: Qualitative and quantitative analysis of proteins and peptides in milk products by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2001, 22, pp. 1510-1517
- [70] Molina, E., Martín-Álvarez, P.J., Ramos, M.: Analysis of cows' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis, *International Dairy Journal*, 1999, 9, pp. 99-105
- [71] Kristiansen, K.R., Otte, J., Zakora, M., Qvist, K.B.: Capillary electrophoresis used to monitor the enzymatic hydrolysis of caseins and the fractionation of hydrolysis products, *Milchwissenschaft*, 1994, 49, pp. 683-688

- [72] Ortega, N., Albillos, S.M., Busto, M.D.: Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis, *Food Control*, 2003, 14, pp. 307-315
- [73] Rehder-Silinski, M., McGown, L.B.: Capillary electrochromatographic separation of bovine milk proteins using a G-quartet DNA stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 2003, 1008, pp. 233-245
- [74] Busnel, J.-M., Descroix, S., Godfrin, D., Hennion, M.-C., Kašička, V., Peltre, G.: Transient isotachopheresis in carrier ampholyte-based capillary electrophoresis for protein analysis, *Electrophoresis*, 2006, 27, pp. 3591-3598

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AMK	aminokyselina
CCP	colloidal calcium phosphate – koloidní fosforečnan vápenatý
CE	capillary electrophoresis – kapilární elektroforéza
CLA	conjugated linoleic acid – konjugovaná kyselina linolová
cmc	critical micellar concentration – kritická micelární koncentrace
CN	casein – kasein
CZE	capillary zone electrophoresis – kapilární zónová elektroforéza
Da	Dalton, jednotka atomové hmotnosti ($1,66 \cdot 10^{-27}$ kg)
DTE	dithioerythritol
DTT	dithiotreitol
HEPPS	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[3-propansulfonová kyselina]
HPMC	hydroxypropylmethylcelulosa
LE	leading electrolyte – vedoucí elektrolyt
MHEC	methylhydroxyethylcelulosa
MK	mastná kyselina
PAL	povrchově aktivní látka
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	sodium dodecyl sulphate – dodecylsulfát sodný
SMODCH	směrodatná odchylka
t – ITP	transient isotachopheresis – přechodná izotachoforéza
TE	terminating electrolyte – koncový elektrolyt
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolet – ultrafialová spektrální oblast
VIS	visible – viditelná spektrální oblast

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č.1: *Přehled systémů kapilární elektroforézy pro stanovení kaseinů v mléce*

<i>Příloha č.1: Systémy CE</i>	<i>Činidla a chemikálie</i>	<i>Příprava vzorků</i>	<i>CE systém</i>
1. Vallejo-Cordoba [65] Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by CE	fosfátový pufr (0,1M; pH 2,5)	1ml mléka zředěn 5 ml fosfátového pufru	BioFocus 3000 (Bio-Rad)
	proteinové standardy	(0,01M; močovina 4,8M; 0,2% Tween 20; pH 2,5)	kapilára pokrytá polyakrylamidem
	detergent Tween 20	pH pufru - 4M kys.fosforečná	(50cm x 50 µm i.d.) udržována při 40°C
	dělicí pufr = 0,05M fosfátový pufr (4M močovina; 0,1% Tween 20; pH 2,5)	vzorky zahřívány 5min při 40°C	vzorky udržovány na 20°C
		odstředění tuku (15min 3000g)	elektrokinetické vstřikování (15kV 6sec.)
		filtrace přes 0,22µm filtr	separace = 20kV, detekce 214 nm
2. Fairise, Cayot [66] New Ultrarapid Method for the Separation of Milk Proteins by CE	dělicí pufr = borátový (3mM; pH 9,5)	mléčný prášek rozpuštěn v deionizované vodě na počáteční obsah sušiny (9,05%); míchání 1hod	Beckman P/ACE 5000 systém
	8,2mM SDS	izolace kaseinových micel z mléka zahřátého na 100°C 4min;	nekrytá křemenná kapilára (27cmx20µm i.d.)
		ultracentrifugace (45000g, 45min, 20°C)	20°C
		proteiny v prostředí močoviny - dialýza	30kV
		použití aniontového surfaktantu SDS 10% (w/w) v kombinaci s DTT 7% (w/w)	UV detekce 214nm
		zahřívání vzorků na 100°C 3min	čas vstřikování 2s
3. Jong et al. [64] Determination of milk proteins by CE	fosfátový pufr (10mM) -NaH ₂ PO ₄ ;	redukční pufr - trisodium citrát dihydrát; DL-DTT;	Beckman P/ACE 2050 systém
	methylhydroxyethylcelulosa (MHEC);	8M urea	hydrofilně pokrytá křemenná kapilára
	8M močovina;	pH 8 - zředěný NaOH	SGE nebo Celect P1 (57cm x 50µm i.d.)
	pH 2,5 - 4M kys. fosforečná	mléko (0,5ml) zředěno 2,5ml redukčního pufru,	45°C
	citrátový pufr (10mM) - trisodium citrát dihydrát; MHEC; 8M urea	inkubováno 1hod při pokojové teplotě	25 nebo 20 kV
	pH 2,45 - 2,5M roztok kys. citronové		vstřikování tlakem (10 - 30s)
	citrátový pufr (20mM, pH 3)		UV detekce 214nm
	pufrы přefiltrovány přes 0,22µm filtr		promývání - směs methanol/voda; pufr; voda
	8M urea - iontoměnič mixed-bed		migrační čas: α-CN 20 -25 min
			β-CN 30 min

4. Otte et al. [67] Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis	pufr - 10mM fosfátový; 6M močovina; pH 2,5 + 0,05% (0,02%) (w/v) hydroxypropyl methylcelulosa (HPMC)	vzorky rozpuštěny v pufru (8M močovina; 10 mM DTE), pH 8 po 1 hodině při pokojové teplotě filtrace (0,45μm)	Waters Ouanta 4000 CE Systém
			hydrofilně pokrytá křemenná kapilára (50μm i.d. x 43cm); nepokrytá (50μm i.d. x 60cm) hydrodynamické vstřikování (15 - 30s) 14 kV, 214 nm
			promývání pufrem (3 - 7min)
			migrační čas: α-CN 20 - 22min k-CN 24,5min β-CN 25 min
5. Molina et al. [70] Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by CE	dělicí pufr - 0,32M kys.citronová; 20mM Na citrát; 6M močovina; 0,05% MHEC; pH 3	mléčný kasein z 10 ml mléka - precipitace 1M HCl při pH 4,6 centrifugace (4500 g, 20min)	Beckman MDQ apparatus hydrofilně pokrytá křemenná kapilára (50μm i.d. x 57cm)
	pufrý přefiltrovány přes 0,22μm filtr	pufr - 167mM Tris(hydroxymethyl)amino-methan; 67mM disodná sůl kys.ethylendinitrilotetraoctové dihydrát; 17mM DL-DTE; 6M močovina; MHEC (0,5 g/l); pH 8,6	vstřikování 15s 25kV, detekce 214nm migrační čas: α-CN 27,65min k-CN 30,38min β-CN 32,45 min
6. Kristiansen et al. [71] CE used to monitor the enzymatic hydrolysis of caseins and the fractionation of hydrolysis products	0,1M fosfátový pufr, 4M močovina; pH 7,3 (NaOH)	vzorkovací pufr - 0,1M fosfátový, 7M močovina, 10mM DTE, pH 7	Waters Quanta 4000
	filtrace přes 0,45μm filtr	vzorky a standardy rozpuštěny v 1ml vzor. pufru	nekrytá křemenná kapilára (60/52,5cm x 75μm i.d.)
			hydrodynamické vstřikování (10s) 10,5kV, detekce 214nm
			migrační čas: α-CN 17 - 19min k-CN 15min β-CN 16 - 17 min

7. Miralles et al. [68] Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by CE	vzorkovací pufr (pH 8,5) - 167mM Tris - (hydroxymethyl)aminomethan; 42mM 3-morpholino-propansulfonová kys.; 67mM disodná sůl kyseliny ethylendinitrilotetraoctové; 17mM DTT; 8M močovina; 0,5g/l MHEC	vzorek - směs 18mg vysráženého kaseinu a 300μl pasterizovaného mléka vysrážený kasein připraven inkubací mléka s chymosinem (1:10000; 0,05g/l) - 37°C, 30min 700 μl vzor. pufru přidáno ke 300μl vzorku	Beckman P/ACE Systém MDQ
			hydrofilně pokrytá křemenná kapilára
			Celect P1 (60cm x 50μm i.d.)
			hydrodyn. vstřikování (3,4kPa; 9s)
			25 nebo 30kV, detekce 214nm
8. Chen, Tusak [63] Characterization of food proteins by CE	borátový pufr - 250 mM pH 10 (roztok NaOH)	všechny proteinové standardy rozpuštěny v pufru obsahujícím 75mM NaCl; 20mM K ₃ PO ₄ ; 0,01% azid sodný, pH 7 koncentrace proteinu 0,2 - 0,5 mg/ml	promývání pufr (6min)
			migrační čas: α-CN 21 -24min
			k-CN 26min
			β-CN 27 - 30min
			P/ACE 2100 CE Systém
9. Cattaneo et al. Characterization of ewe's milk by CZE	pufr 1 - 5mM citrát trisodný dihydrát; 9M močovina, 30mM DTT - filtrace elektrolyt - citrátový pufr - 20mM citrát trisodný dihydrát; 6M močovina, 0,05% MHEC; pH 3 - kys.citronová	vzorky mléka zředěny pufr 1 (1:4) inkubováno 1hod při pokojové teplotě, mícháno, filtrace přes 0,45μm filtr kasein připraven přidáním 0,1M HCl na pH 4,6; kasein rozpuštěn v pufru 1 - 0,8% (w/v)	nepokrytá kapilára (20μm i.d. x 25cm), 23°C
			hydrodyn. vstřikování (15- 30s)
			10kV
			detekce 200nm
			promývání - 1M NaOH, voda, borátový pufr
9. Cattaneo et al. Characterization of ewe's milk by CZE	pufr 1 - 5mM citrát trisodný dihydrát; 9M močovina, 30mM DTT - filtrace elektrolyt - citrátový pufr - 20mM citrát trisodný dihydrát; 6M močovina, 0,05% MHEC; pH 3 - kys.citronová	vzorky mléka zředěny pufr 1 (1:4) inkubováno 1hod při pokojové teplotě, mícháno, filtrace přes 0,45μm filtr kasein připraven přidáním 0,1M HCl na pH 4,6; kasein rozpuštěn v pufru 1 - 0,8% (w/v)	migrační čas: α-CN 6 min
			β-CN 5 min
			BioFocus 3000 (Bio-Rad)
			hydrofilně pokrytá křemenná kapilára
			Celect P1 (55cm x 50μm i.d.)
9. Cattaneo et al. Characterization of ewe's milk by CZE	pufr 1 - 5mM citrát trisodný dihydrát; 9M močovina, 30mM DTT - filtrace elektrolyt - citrátový pufr - 20mM citrát trisodný dihydrát; 6M močovina, 0,05% MHEC; pH 3 - kys.citronová	vzorky mléka zředěny pufr 1 (1:4) inkubováno 1hod při pokojové teplotě, mícháno, filtrace přes 0,45μm filtr kasein připraven přidáním 0,1M HCl na pH 4,6; kasein rozpuštěn v pufru 1 - 0,8% (w/v)	vstřikování tlakem (34 474Pa, 8s)
			25kV, detekce 214nm